Beiträge zur Kenntnis der sogenannten schwarzen Hefen.

Von der

K. Technischen Hochschule zu München zur Erlangung der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften (Doktor-Ingenieurs) genehmigte Dissertation.

Vorgelegt von

Fritz Noldin

aus Salurn.

Referent:
Prof. Dr. Karl Giesenhagen.

Korreferent:
Prof. Dr. Carl J. Lintner

Tag der Annahme der Dissertation: 25. November 1912.
Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 1912.

München 1912.
Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Beiträge zur Kenntnis der sogenannten schwarzen Hefen.

Von der

K. Technischen Hochschule zu München zur Erlangung der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften (Doktor-Ingenieurs) genehmigte Dissertation.

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Vorgelegt von

Fritz Noldin

aus Salurn.

Referent:
Prof. Dr. **Karl Giesenhagen.**

Korreferent:
Prof. Dr. **Carl J. Lintner**

Tag der Annahme der Dissertation: 25. November 1912.
Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 1912.

München 1912.
Kgl. Hofbuchdruckerei Kastner & Callwey.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546317_0111

Vorliegende Arbeit wurde im physiologischen Laboratorium der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München im Oktober 1911 auf Veranlassung des Herrn Prof. Dr. H. Will begonnen und ebendort im Oktober 1912 vollendet.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H. Will für die Anregung und reichliche Unterstützung meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Inhalts-Verzeichnis.

Einleitung 1
Allgemeine Morphologie 13
Spezielle Morphologie 15
Sporenbildung 17
Wachstumserscheinungen in und auf verschiedenen Nährböden:

I. Flüssige Nährböden

a) Tröpfchenkulturen 19
b) Adhäsionskulturen 23
c) Wachstumserscheinungen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit 24
Gehopfte Würze 26
Ungehopfte Würze 28
Kartoffelwasser 29
Gelbrübenwasser 31
Krautwasser 32
Milch 33
Hefenwasser 34
Gehopfte Bierwürze mit Zusatz von Aethylalkohol 34
Hayduck'sche Nährlösung mit Zusatz von Säuren 35
Hayduck'sche Nährlösung mit Zusatz von verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen 37

II. Feste Nährböden

a) Einzellkulturen 39
b) Riesenkolonien 43
Gehopfte Würzegelatine 46
Ungehopfte Würzegelatine 48
Kartoffelwassergelatine 48

Gelbrübenwassergelatine 50
Krautwassergelatine 50
Physiologie:
Generationsdauer 54
Einfluß verschiedener Temperaturen 56
Verhalten gegenüber Aethylalkohol 58
Verhalten gegenüber organischen Säuren . . 59
Einwirkung auf verschiedene Zuckerarten . 63
Verhalten gegenüber verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen 65
Literatur 71

Einleitung.

Die bisher von verschiedenen Forschern veröffentlichten Angaben über die sogen. schwarzen Hefen sind insoferne übereinstimmend, als es sich in allen Fällen um dunkelgefärbte Pilzzellen handelt, welche sich durch Sprossung vermehren. Ob mit diesen Sproßzellen der Entwicklungskreis des Pilzes abgeschlossen ist, scheint von den Autoren entweder überhaupt nicht weiter untersucht worden zu sein, oder es findet sich keine direkte Angabe darüber vor. Nur in einem Berichte wird angeführt, daß neben den Sproßzellen auch Hyphen auftreten.

Sogenannte schwarze Hefen waren wohl schon früher bei Luftuntersuchungen gefunden worden. Der erste jedoch, der etwas eingehender über eine schwarze Hefe berichtet, war G. Marpmann[1]). Er sonderte eine solche aus Kuhmilch ab. Die Zellen waren kugelförmig bis oval, von 1,5—3,0 μ Durchmesser und vermehrten sich durch Sprossung. Marpmann will auch Sporenbildung beobachtet haben. Nach seiner Angabe kommen 3—4 Sporen in einer Zelle vor. Er benennt deshalb auch seine schwarze Hefe Saccharomyces niger.

Als besondere Eigentümlichkeit erwähnt Marpmann noch, daß sich einzelne Zellen fän-

den, welche eine regelmäßige Teilung zeigen. Diese Erscheinung erklärt er durch das Zusammenpressen zweier nach der Vermehrung zusammenhängender Zellen durch ihre Umgebung. In Nährlösung wächst nach den Versuchen Marpmanns der Pilz sehr langsam und bildet schwarze Sedimente. Saccharose und Milchzucker werden nicht vergoren; dagegen Traubenzucker in sehr geringem Grade.

In Zuckernährlösungen wuchs der Pilz nicht zu Fäden aus. Ob dies in anderen Nährflüssigkeiten der Fall war und ob schon Marpmann Hyphenbildung beobachtet hatte, war aus den sehr kurz gehaltenen Angaben nicht ersichtlich. Auf Nährgelatine entstanden samtschwarze Rasen. Da aber nach unseren später darzulegenden Beobachtungen die samtartige Beschaffenheit der Oberfläche einer Kultur durch Mycelbildung bedingt ist, kann aus Marpmanns Angaben mit Sicherheit geschlossen werden, daß seine Hefe auch Mycelfäden bildete.

Eine direkte Bestätigung findet unsere Schlußfolgerung durch die allerdings ebenfalls sehr kurzen Ausführungen von Emil Chr. Hansen[2]), welcher Untersuchungen am Originalmaterial von Marpmann anstellte. Er sagt: Das Hauptresultat der Untersuchungen war, daß die schwarze Hefe nicht einer Saccharomyces-, sondern einer Cladosporium- oder Fumago-Art angehöre, also sich in den Entwicklungskreis eines Mycelpilzes einreihe. Ferner: unter gewissen Bedingungen zeigten sich zwar in den Zellen kleine Körperchen, die Ähnlichkeit mit Sporen hatten, aber sie keimten

nicht und hatten auch nicht den gewöhnlichen Bau der Sporen. Unter Einwirkung von Alkohol lösten sie sich außerdem. Die bisher untersuchten dunkelgefärbten Sproßpilze gehören zwar verschiedenen Arten an, stimmen aber alle damit überein, daß ihnen die oft besprochene Sporenbildung abgeht und daß sie nicht Gärung hervorrufen.

Deutlicher spricht sich P. Lindner[3]) aus: Im Kralschen Laboratorium wird ebenfalls eine „schwarze Hefe" schon seit Jahren kultiviert. Diese bildet in jüngeren Kulturen auf dem Impfstrich ein schwarzes Polster aus Sproßzellen. Später entwickelt sich auf diesem Polster ein dunkelgrüner Rasen, aus lauter Hyphen bestehend. Außerordentlich charakteristisch ist das Wachstum im Impfstich in Gelatineröhrchen. Schon nach wenigen Tagen sieht man denselben von einer Menge strahlenförmiger Verzweigungen umgeben, die sich allmählich verbreitern und bei zunehmendem Alter schwarz färben. In älteren Kulturen bekommen wir das Bild eines reichverzweigten Baumes, der gewissermaßen auf der Spitze steht und dessen Wurzeln in der Oberfläche der Gelatine zu suchen wären. Bei Kulturen in Bierwürze bilden sich auf der Oberfläche kleine Mycelien, in deren Mitte ein aus Sproßzellen bestehender breiiger Kuchen heranwächst. Aehnliche Mycelien bilden sich auch unmittelbar ober- und unterhalb der Flüssigkeit an der Glaswand.

Torula nigra von Guilliermond[4]) vegetiert auf Karotten üppig; deren Oberfläche ist 24 Stunden nach der Aussaat von einer klebrigen, schwarzgrünen Masse überzogen, welche aus-

schließlich aus ovalen und leicht verlängerten Sproßzellen zusammengesetzt ist. Diese werden durch einen Schleim zusammengehalten, in welchem sich einige schwärzliche festere Partikelchen befinden. Nach einigen Tagen entstand auf dem weniger feuchten Teile des Nährbodens ein sehr dünnes Mycel, welches aus der schwarzen Hefenmasse hervorkommt und sich in Form eines grauen Filzes abhebt. Nach der Anschauung von Guilliermond gliedert sich der Pilz wahrscheinlich an Dematium an.

P. Lindner[5]) erwähnt eine von Zeidler in Moskau isolierte schwarze Hefe, welche von derjenigen des Kochschen Laboratoriums verschieden war. Sie bestand aus ellipsoidischen Zellen von ca. 6 μ Längendurchmesser. Auf Würzegelatine wuchs sie im Gegensatz zu derjenigen des Kochschen Laboratoriums mit feuchter, gekröseartig gefalteter Oberfläche, auf der später nur eine spärliche Wolle sich entwickelte. In der Tröpfchenkultur erschienen fädige Elemente nicht.

Erwähnt sei noch, daß nach den Angaben von B. H. Buxton[6]) Saccharomyces niger nur Maltase und Invertase, nicht aber Diastase, Laktase und Inulase enthielt.

Aus dieser kurzen Literaturübersicht geht also hervor, daß über die Morphologie der sogenannten „schwarzen Hefen" noch recht wenig bekannt ist und noch viel weniger über ihre Physiologie. Systematische Untersuchungen sind überhaupt noch nicht durchgeführt worden.

Infolgedessen veranlaßte mich Herr Prof. Will an einigen Kulturen verschiedenen Ur-

sprunges vergleichende Untersuchungen nach den für die Unterscheidung der Sproßpilze z. Z. gültigen Richtpunkten durchzuführen.

Die Fragestellung war folgende:

1. Morphologie und die für die Gewinnung von Unterscheidungsmerkmalen wichtigeren physiologischen Eigenschaften der einzelnen Formen.
2. Vergleich der einzelnen Formen untereinander.
3. Systematische Stellung der drei Formen. Sind es Sproßpilze ohne Bildung eines typischen Mycels? Entstehen in den Sproßzellen Sporen oder nicht? Gehören die untersuchten Formen infolgedessen zu den Saccharomyceten oder zu anderen Sproßpilzgruppen ohne Sporenbildung? Sind es Pilze mit typischem Mycel, welche Sproßzellen erzeugen? Erfolgt die Vermehrung unter bestimmten Bedingungen vorherrschend durch Sprossung?
4. Vermögen die drei Formen Gärung zu erregen?

Die Lösung dieser Fragen wurde durch folgende Versuche angestrebt:

Die Pilze wurden unter verschiedenen Kulturbedingungen (feste und flüssige Nährböden bei verschiedener Temperatur) gezüchtet und die dabei zutage tretenden Wachstumserscheinungen, Zellformen und Zellverbände beobachtet. Ein besonderes Augenmerk wurde bei allen Versuchen auf die Bildung von Mycel gerichtet. Zur Prüfung auf Sporenbildung wurden teilweise die Verfahren,

wie sie von Zikes[7]) für Apiculatus angegeben wurden, angewendet.

Außerdem wurde das Verhalten der 3 Pilzformen gegenüber verschiedenen Zuckerarten und Stickstoffquellen, gegenüber Aethylalkohol und organischen Säuren und anderes mehr studiert, um allenfalls auf diesem Wege zur Erkenntnis von Artmerkmalen zu gelangen.

Die Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf drei Organismen, bezeichnet als Form I, II und III, die uns in sehr zuvorkommender Weise von folgenden Instituten aus ihrem Sammlungsmaterial zur Verfügung gestellt wurden, wofür ich an dieser Stelle meinen wärmsten Dank zum Ausdruck bringen möchte.

Form I. Hefereinzuchtstation zu Geisenheim a. Rh., als Saccharomyces niger bezeichnet.

Form II. Hygienisch-bakteriologisches Institut der k. Universität Erlangen.

Form III. K. Hygienisches Institut der Albertus-Universität Königsberg i. Preußen.

Das Aussaatmaterial bei den einzelnen Versuchen entstammte 8—12 Tage alten Kulturen in gehopfter Bierwürze und bestand somit vorherrschend aus Sproßzellen.

Die für die Versuche verwendeten Nährböden zerfallen in zwei Gruppen: 1. flüssige, 2. feste.

Von flüssigen kamen zur Anwendung:[8])

1. Ungehopfte Bierwürze von 11—12° Ball.
2. Gehopfte Bierwürze von 11—12° Ball.
3. Kartoffelwasser.
4. Gelbrübenwasser.
5. Weißkrautwasser.

6. Milch, entrahmt.
7. Hefewasser.
8. Mineralische Nährlösung nach Hayduk von folgender Zusammensetzung:

25 g KH_2PO_4
8,5 g $MgSO_4$
5 g Zucker
20 g Pepton Witte
} auf 1 l dest. Wass.

Als feste Nährböden dienten:

1. Würzegelatine aus ungehopfter und gehopfter Bierwürze (10 proz.).
2. Kartoffelwassergelatine (10 proz.).
3. Gelbrübenwassergelatine (10 proz.).
4. Weißkrautwassergelatine (10 proz.).
5. Kartoffel (in Form von keilförmigen Stükken in Reagenzröhrchen).
6. Gelbrüben (in Form von keilförmigen Stükken in Reagenzröhrchen).

Allgemeine Morphologie.

Die drei untersuchten Formen sind Hyphomyceten, welche Konidien erzeugen. Es tritt in den Kulturen einerseits ein typisches Mycel und andererseits ein Sproßmycel auf, dessen Glieder sich teilweise sehr bald trennen, teilweise im Zusammenhang bleiben.

Je nach den Kulturbedingungen herrschen die Sproßzellen oder das Mycel vor. Bei Einsaat von Konidien oder Sproßzellen vermehren sich diese anfangs durch Sprossung. Nach einer gewissen Zeit, meist nach 3—4 Tagen, beginnt die Entwick-

lung der Hyphen (Tafel II, Fig. 3). Die anfangs gedrungenen Sproßzellen gehen zunächst in langgestreckte Formen über, die einander meist mit breiter Basis aufsitzen. Bei weiterem Wachstum gehen diese allmählich in einen in kurzen Abständen durch Querwände geteilten Schlauch über. Später werden die Querwände der Hyphe seltener und dünner, so daß sie oft nur mehr schwer erkennbar sind.

Das Mycel verzweigt sich und erzeugt kugelförmige oder ellipsoidische Konidien (Fig. 6, Tafel II, Fig. 4, 5 u. 6). Diese sitzen entweder direkt dem Mycelfaden oder einer kurzen Ausstülpung desselben auf. Die Konidien können an Ort und Stelle entweder Sproßzellen erzeugen oder sie wachsen wieder zu Hyphen aus (Fig. 5). Die Zellwand der Sproßzellen und der Hyphen ist nach außen scharf begrenzt und sehr oft, besonders bei Zellen älterer Kulturen, verdickt und dunkelgrün gefärbt. Diese Zellen mit verdickter Membran sind als Gemmen aufzufassen.

Die beiden Elemente, Sproßkonidien und typisches Mycel, setzen die Pilzrasen, die in den verschiedenen Kulturen als Ringbildung, Hautinseln, Riesenkolonien, Absätze usw. auftreten, zusammen und verleihen diesen, je nachdem das eine oder das andere Element vorherrscht, bei den einzelnen, untersuchten Pilzformen ein besonderes Gepräge. Hierüber geben die folgenden Ausführungen Aufschluß.

Spezielle Morphologie.

Form I.

Die allgemeine Form der meist isolierten Sproßzelle ist gestreckt ellipsoidisch (Fig. 1). Außerdem finden sich unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen noch verschiedene andere Formen, wie runde, langgestreckte, wurstförmige, keulenförmige und ganz unregelmäßig gestaltete. Nicht selten zeigen die Zellen sogar eine apiculatusähnliche Zuspitzung an einem der beiden Pole.

Der Inhalt der Sproßzellen ist blaß, läßt aber häufig sehr stark lichtbrechende Körperchen hervortreten, die in Bezug auf Größe, Anzahl und Lagerung in der Zelle keine Regelmäßigkeit erkennen lassen.

Gemmenbildung ist häufig zu beobachten.

Die Farbe einzeln liegender Zellen ist rauchgrau. Liegen sie in dichteren Gruppen, so erscheinen sie olivgrün bis dunkelgrün gefärbt.

Die Größe der Sproßzellen ist je nach ihrer Gestalt sehr verschieden. Folgende Zahlen sind Durchschnittswerte von 24 Messungen:

1. Gestreckt-ellipsoidische 8,45 μ lang, 3,89 μ breit.
2. Langgestreckte 13,58 μ lang, 2,65 μ breit.

Die Hyphen, die fast in allen Kulturen vorkommen, sind 1,4—1,6 μ breit, sie sind schwach lichtbrechend, ihr Inhalt ist homogen, in älteren Kulturen granuliert. Ist letzteres der Fall, so bilden die Fetttröpfchen nicht eine geschlossene Reihe, sondern es befinden sich zwischen densel-

ben Zwischenräume, Wandverdickung tritt auch beim Mycel auf.

Form II.

Von Form I nur durch geringe Abweichungen verschieden, ist Form II trotzdem schon bei oberflächlicher Betrachtung des mikroskopischen Bildes zu erkennen. Die Gestalt der Sproßzellen ist nämlich eiförmig. Die durch Sprossung erzeugten Zellen bleiben hier lange im Verbande und bilden Ketten, deren Glieder einander mit breiter Basis aufsitzen und durch eine zarte Scheidewand getrennt sind (Fig. 2).

Inhalt und Zellmembran zeigen Uebereinstimmung mit Form I. Gemmenbildung.

Im Vergleich zu Form I ist das Bild der Sproßzellen nicht so einheitlich, man findet hier viel häufiger Abweichungen von der Grundform, und zwar können vorkommen kugelförmige, wurstförmige und unregelmäßig gestaltete Zellen. Die Größenverhältnisse sind im nachfolgenden durch Durchschnittszahlen von 24 Messungen angegeben.

Runde Zellen 5,15 μ.

Langgestreckte 12,0 μ lang, 2,9 μ breit.

Eiförmige 7,6 μ lang, 3,97 μ breit.

Die Hyphen verhalten sich in Bezug auf Bau und Größe wie Form I. In einzelnen Fällen zeigen sie geringfügige Abweichungen.

Form III.

Die Sproßzellen haben vorherrschend Kugelgestalt (Fig. 3); als Abweichungen von dieser Form kommen gestreckt-ellipsoidische, eiförmige und wurstförmige vor.

Der Zellinhalt ist hier etwas stärker lichtbrechend als bei den anderen beiden Formen. Sehr häufig führt er kleine Fetttröpfchen von wechselnder Zahl, die gewöhnlich unregelmäßig verteilt sind. In älteren Würzekulturen erscheinen die Fetttröpfchen größer und ähnlich wie Sporen in Zellen von Saccharomyceten gelagert (Tafel II, Fig. 2). Durchmesser der kugelförmigen Sproßzellen 4,5 μ; ovale Sproßzellen 5,9 μ lang, 3,7 μ breit.

Die Zellhaut ist von derjenigen der anderen Formen nicht verschieden.

Die Mycelbildung ist nicht so üppig wie bei den beiden anderen Formen. Das Mycel tritt hier gegenüber den Sproßzellen zurück. Mycelwand häufig verdickt und dunkelgrün gefärbt.

Sporenbildung.

Wie aus der Darstellung der morphologischen Verhältnisse hervorgeht, haben wir es bei den vorliegenden Organismen mit Fadenpilzen zu tun, deren Konidien befähigt sind, zahlreiche Sproßgenerationen zu erzeugen. Nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen findet bei jenen eine endogene Sporenbildung wie bei den Saccharomyceten nicht statt. Da diesen Sproßzellen der „schwarzen Hefen" in der Literatur Sporenbildung zugeschrieben wird, sollte durch eine Reihe von Versuchen eingehend geprüft werden, ob nicht doch durch geeignete Heranzüchtung und Behandlung in den Sproßzellen Sporenbildung hervorgerufen werden kann. Die Versuche wur-

den in der Weise variiert, daß das Ausgangsmaterial in verschiedenen, geeigneten Nährflüssigkeiten herangezüchtet wurde, so z. B. in gehopfter Würze + Dextrose, ungehopfter Würze und Kartoffelwasser.

Ferner wurden die Gipsblöcke nach den Angaben von Zikes[7]) außer mit Wasser auch noch mit Gipswasser und mit den oben erwähnten Nährflüssigkeiten getränkt.

Neben den Gipsblöcken wurde auch das in verschiedener Weise herangezüchtete Aussaatmaterial auf Karotten und Kartoffeln, die unter Umständen ein geeignetes Substrat für Sporenkulturen abgeben, aufgetragen.

Alle diese Verfahren, die geeignet sind, bei den Saccharomyceten Sporenbildung zu veranlassen, blieben hier erfolglos. In dem von Marpmann angeführten Falle scheint es sich also wohl nicht um Sporen gehandelt zu haben, sondern vielmehr um Fetttröpfchen, die auch im Verlaufe dieser Untersuchungen sehr häufig in einer mit Sporen leicht zu verwechselnden Form und Anordnung in den Sproßzellen auftraten (Fig. 4; Taf. II, Fig. 2). Mit Osmiumsäure gaben die stark lichtbrechenden, sporenähnlichen Gebilde die bekannte Reaktion, bei Alkoholbehandlung lösten sie sich auf. Nach Aussaat der die fraglichen Körperchen enthaltenden Zellen in Nährlösungen zeigten jene unter den sonst für die Sporenkeimung günstigen Bedingungen keine irgendwie geartete Erscheinung, welche zu dem Schluß hätte führen können, die sporenähnlichen,

stark lichtbrechenden Körperchen als endogene Sporen anzusprechen.

Wachstumserscheinungen in und auf verschiedenen Nährböden.

1. Flüssige Nährböden.

a) Tröpfchenkultur.

Die Tröpfchenmethode nach P. Lindner[9]) ermöglicht es, eine einzelne Zelle zu isolieren und ihre Fortpflanzung zu beobachten. Dadurch erzielt man:

1. Genauen Aufschluß über die bei der Vermehrung in geringen Mengen von Flüssigkeit stattfindenden Vorgänge.
2. Durch die Erkenntnis dieser Vorgänge, die oft sehr charakteristischer Natur sind, ein Mittel zur Unterscheidung von Arten.

Als Nährflüssigkeit diente gehopfte Bierwürze. Die Anlegung erfolgte in der von P. Lindner angegebenen Weise auf dem hohlgeschliffenen Objektträger.

Form I.

Die Vermehrung erfolgte im Würzetröpfchen ausschließlich durch Sprossung. Selbst in mehrere Wochen alten Kulturen war Mycelbildung nicht erfolgt. Die Tochterzelle sitzt an einem der beiden Pole der Mutterzelle und wächst in der Richtung von deren Längsachse fort (Fig. 1). Zuweilen ist die Tochterzelle der Mutterzelle etwas seitlich angesetzt und bildet dann mit der Längsachse der Mutterzelle einen spitzen Winkel. Die

Tochterzellen lösen sich verhältnismäßig bald ab und liegen im Tröpfchen zerstreut herum. Zuweilen findet sich auch Parallellagerung in ähnlicher Weise wie bei Mycoderma. Ab und zu kommt es auch vor, daß die Zellen längere Zeit im Verbande bleiben und so 4—5 gliedrige, unverzweigte Reihen bilden, oder daß 3—4 kreuzförmig angeordnet sind.

Fig. 1.

Fig. 1 Form I. Sprossende Zellen in gehopfter Würze. 40 Stunden alte Tröpfchenkultur bei Zimmertemperatur. 500 : 1.

Nach zwei Tagen hatte starke Vermehrung stattgefunden. Die Zellen lagen auf einem dichten Haufen, der grünlich gefärbt war. Der Peripherie zu lagen die Zellen weniger dicht und am Rande einzeln. Sproßverbände waren nicht zu beobachten. Hin und wieder fand man Riesenzellen von ovaler oder runder Form.

Form II.

Die Fortpflanzung der Einsaat erfolgt auch hier nur durch Sprossung. Zum Unterschied von Form I bleiben die Zellen aber lange Zeit im Verbande, und es entstehen Reihen von Zellen, die sich später verzweigen (Fig. 2). Die Zweige des

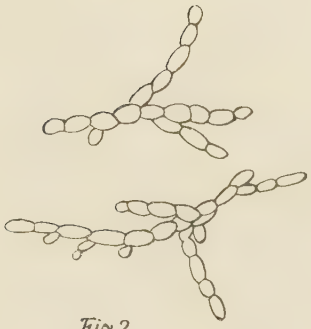

Fig. 2 Form II. Sprossende Zellen in gehopfter Würze. 40 Stunden alte Tröpfchenkultur bei Zimmertemperatur. 500 : 1.

Sproßmycels strahlen nach allen Richtungen unregelmäßig aus, häufiger jedoch, besonders nach kräftiger Vorernährung, entstehen Sproßmycelien, welche mehr oder weniger regelmäßige sternartige Anordnung zeigen. Die Tochterzelle sitzt einem Pole der Mutterzelle auf. Die Tochterzelle kann dann entweder in der Richtung der Längsachse der Mutterzelle oder, was hier sehr häufig zutrifft, in einem Winkel von ungefähr 45° weiterwachsen, wodurch das strahlenförmige, sparrige Aussehen der jungen Kolonie bedingt ist. Von der geschlossenen Kolonie lösen sich kleinere Zellverbände und einzelne Zellen los.

Form III.

Die Vermehrung erfolgt im Würzetröpfchen ebenfalls durch Sprossung; Mycelbildung wurde niemals beobachtet. Die neu entstandenen Zellen lösen sich aber wie bei Form I bald aus dem Verbande los. Ausnahmsweise findet man Sproßverbände von 4—6—8 Gliedern (Fig. 3). Die Zel-

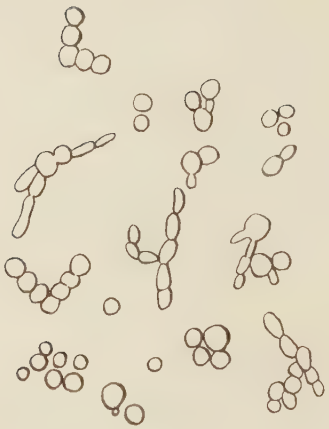

Fig. 3.

Fig. 3 Form III. Sprossende Zellen in gehopfter Würze. 40 Stunden alte Tröpfchenkultur bei Zimmertemperatur. 500:1.

lenreihen sind gerade und in der Regel unverzweigt. Nur in einigen Fällen fand eine Sprossung im rechten Winkel zu der anfänglichen Richtung statt.

In einigen Tröpfchen waren Riesenzellen vorhanden, deren Lumen von einer großen Vakuole erfüllt war.

Die Tröpfchenkulturen haben also gezeigt, daß zwischen den drei Formen geringe, aber konstante Unterschiede hauptsächlich in der Richtung bestehen, daß die Sproßgenerationen entweder zu festen, zusammenhängenden Sproßmycelien, die sich verzweigen, vereinigt bleiben oder sich voneinander bald trennen. Nachträgliche Versuche zeigten, daß sich wohl auch im Würzetröpfchen Hyphen entwickeln können, und zwar tritt dieser Fall ein, wenn statt der hohlgeschlif-

fenen Objektträger Böttchersche feuchte Kammern verwendet werden.

b) Adhäsionskultur.

Die Anlegung erfolgte ebenfalls nach P. Lindner[10]) auf dem hohlgeschliffenen Objektträger. Die Kulturen wurden bei Zimmertemperatur zwei Wochen lang beobachtet.

Form I.

Die Sprossung vollzieht sich in ganz ähnlicher Weise wie im Tröpfchen. Die in der Adhäsionskultur entstehenden Zellen unterschieden sich jedoch dadurch, daß sie fast durchwegs apiculatusähnliche Zuspitzung hatten. Auffallend war überdies das Auftreten von langgestreckten Zellen, die aber nicht in Hyphen übergingen.

Form II.

Auch hier finden wir im Anfangsstadium der Vermehrung dieselben Verhältnisse wie im Tröpfchen. Nach einigen Tagen entwickelten sich aber in vereinzelten Fällen aus den gedrungenen ovalen Sproßkonidien auch langgestreckte Zellen, die dann in Hyphen übergingen, eine Erscheinung, die im Tröpfchen nicht beobachtet wurde. Der Uebergang zur Mycelform ist vielleicht durch Mangel an Nährstoffen veranlaßt.

Form III.

Die ebenfalls durch Sprossung entstandenen Zellen unterscheiden sich von den im Tröpfchen entstandenen Sproßzellen nur durch die häufig auftretende Zuspitzung. Langgestreckte Zellformen oder Hyphen wurden im Gegensatz zu Form I und Form II nicht beobachtet.

Die Beobachtungen in den Adhäsionskulturen, die gelegentlich zur Bestimmung der Generationsdauer (siehe physiolog. Teil) gemacht wurden, zeigen im allgemeinen Uebereinstimmung mit jenen im Tröpfchen. Ein wesentlicher Unterschied trat nur bei Form II ein, die Mycel entwickelte, während dies im Tröpfchen nicht der Fall war. Die häufig in den Adhäsionskulturen beobachtete apiculatusähnliche Zuspitzung der Zellen kann trotzdem nicht als eine für jene charakteristische Erscheinung bezeichnet werden.

c) Wachstumserscheinungen in grösseren Mengen von Nährflüssigkeit.

Allgemeiner Teil.

Erlenmeyerkölbchen wurden mit 50 ccm der betreffenden Nährlösung beschickt, nach dem Sterilisieren im Dampftopf mit einem der Pilze geimpft und bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Bei dieser Art von Kulturen kann man in den verschiedenen Nährflüssigkeiten eine Reihe von immer wiederkehrenden Wachstumserscheinungen beobachten, die also für diese Kulturen charakteristisch sind. Sie sollen vorerst hier kurz beschrieben werden.

Als erste Anfänge einer äußerlich sichtbaren Vegetation treten meistens ganz kleine Pilzkolonien entweder an der Wand des Gefäßes oder in der Flüssigkeit auf. Anschließend daran kommt es zur Entwicklung eines Bodensatzes, der entweder schlammartig oder flockig ist, je nachdem er aus Sproßzellen oder aus Mycel besteht.

In ein neues Stadium der Entwicklung treten die Kulturen in der Regel 12 oder 14 Tage nach

der Beimpfung mit dem Erscheinen einer Oberflächenvegetation. Dabei siedeln sich am Rand des Flüssigkeitsspiegels eine Reihe von kleinen Pilzinseln an, die sich dann im weiteren Verlaufe der Zeit ausdehnen, bis sie sich gegenseitig berühren und durch Verfilzung einen mehr oder weniger stark ausgebildeten Ring bilden. Der Ring, der eine Breite von 5—10 mm erreichen kann, hat in sich einen so festen Zusammenhalt, daß er sich wie ein Band von der Wand des Gefäßes loslösen läßt. Er hat eine weich-knorpelige Beschaffenheit und läßt zwei verschieden gefärbte Zonen erkennen: eine obere dunkelgefärbte, oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche liegend, und eine untere, in der Flüssigkeit befindliche hellere. Die dunkle Farbe der ersteren rührt davon her, daß die stark verdickte Wandung der Sproßzellen und des Mycels intensiv grünlich gefärbt ist. Die starke Verdickung scheint durch die direkte Berührung derselben mit der Luft beeinflußt zu sein (Fig. 4).

Fig. 4.

Fig. 4 Form I. Starkwandige Mycelstücke und Sproßzellen mit Fetttröpfchen aus dem Ring einer 1 Monat alten Würzekultur; Zimmertemperatur. 500 : 1.

Die Ringbildung ist in geeigneten Nährlösungen meist von einer Hautbildung begleitet. Bei dieser erscheinen zuerst ganz kleine, kaum wahrnehmbare Pilzinseln von tiefschwarzer Farbe und lackartigem Glanze. Im weiteren Verlaufe der Entwicklung verhalten sie sich in Bezug auf Form in den einzelnen Nährlösungen verschieden. Am häufigsten stellen die kleinen Pilzrasen eine an der Oberfläche konvex gewölbte Scheibe dar, die einen Durchmesser bis zu 6 mm erreicht. An ihrer Unterseite hängt ein Büschel von Mycelfäden derart nach abwärts, daß die Pilzrasen von der Seite betrachtet fast kugelförmig erscheinen.

Diese Wachstumsform findet sich in den meisten Nährflüssigkeiten. Geringe Abweichungen von diesem Typus werden gelegentlich im speziellen Teile Erwähnung finden.

Aehnlich wie bei den Pilzinseln des Ringes tritt häufig auch hier eine Verschmelzung und Verfilzung ein, wodurch eine geschlossene Haut entsteht, welche die Flüssigkeit überzieht und meistens mit dem Ring in Zusammenhang tritt. Die mikroskopische Untersuchung der Haut hat ergeben, daß sie aus einem dichten Flechtwerk von Hyphen und Sproßzellen besteht. Welches dieser beiden Elemente stärker ausgebildet ist, hängt von der Zusammensetzung der Nährlösung ab.

Gehopfte Würze.

Form I.

Am 5. Tage kleine, in der Flüssigkeit schwimmende Kolonien, am 10. Tage ziemlich starker

Bodensatz, Flüssigkeit trübe und Anfänge einer Oberflächenvegetation. Am 15. Tage starker Ring und einzelne Hautinseln. Am 20. Tage Flüssigkeit von einer geschlossenen Haut bedeckt, deren Oberseite dunkelgrün gefärbt, glatt und ohne Erhebung war.

Haut und Ring bestanden aus Mycel und eingelagerten Konidien, im allgemeinen von normalem Aussehen.

Der Bodensatz enthielt ovale Sproßzellen, die einzeln lagen oder zu zweien verbunden waren. Größere Verbände nur ganz ausnahmsweise.

Sproßzellen wie Mycel zeigten häufig Wandverdickung (Gemmen) und kleine Fetttröpfchen.

Form II.

In der äußerlichen Entwicklung vollkommen gleich wie Form I, zeigt diese Kultur jedoch bei mikroskopischer Untersuchung nach 1 Monat einige Verschiedenheiten. Das Mycel, das an der Glaswandung oberhalb des Flüssigkeitsrandes wuchs, war weit intensiver gefärbt; die einzelnen Fäden waren im allgemeinen dünner. Auch die Konidien waren stärker gefärbt und hatten stärkere Wandung. Sie enthielten regelmäßig Fetttröpfchen, die oft so groß waren, daß sie das ganze Lumen der Zelle ausfüllten. Der Bodensatz bestand aus Sproßzellen, die vielfach zu größeren Verbänden vereinigt waren. Unter den Sproßzellen fanden sich solche mit apiculatusähnlicher Zuspitzung vor.

Form III.

Analog den beiden anderen Formen, nur weit langsamer, war auch die Entwicklung von Form III.

Am 14. Tage traten die ersten Anzeichen einer Ring- und Hautbildung auf. Am 28. Tage war fast die ganze Flüssigkeit von einer dünnen Haut bedeckt, deren Festigkeit ebenso wie beim Ring sehr mangelhaft war. Als Ursache dieser Erscheinung wurde der Umstand erkannt, daß ein typisches Mycel entweder überhaupt nicht oder nur mit ganz kurzen Fäden zur Entwicklung gekommen war.

Der Bodensatz bestand aus kugelförmigen und gestreckt ellipsoidischen Zellen, die einzeln und in größeren Verbänden auftraten, durchwegs granuliert waren und häufig deutlich verstärkte Wandung hatten.

Nach weiteren 14 Tagen fielen in den Sproßzellen abnorm große Fetttropfen auf, die wegen ihrer Zahl (3—6) (Taf. II, Fig. 2) und ihrer regelmäßigen Lagerung in der Zelle, leicht zur Verwechslung mit Sporen hätten Anlaß geben können.

Ungehopfte Würze.

Form I.

Am 2. Tag hatten sich innerhalb der Flüssigkeit kleine, an der Wand festsitzende Kolonien gebildet. Am 5. Tage umgab eine Reihe von Pilzinseln den Flüssigkeitsrand. Am 10. Tage Flüssigkeit trübe, starker Ring und beginnende Hautentwicklung. Die anfänglich glatte Haut zeigte am 20. Tage schüsselförmige Vertiefungen, sie erstreckte sich über die ganze Flüssigkeitsoberfläche. Nach einem Monat war sie grob gefaltet; die grau gefärbten Faltungen bedeckte ein Luftmycel. Haut mit dem Ring fest verbunden.

In anatomischer Hinsicht war die Haut im allgemeinen gleich wie auf gehopfter Würze, unterschied sich jedoch durch das Auftreten von Luftmycel.

Im Bodensatz fanden sich kugelförmige, ovale und langgestreckte Sproßkonidien, die große Vakuolen und große Fetttröpfchen enthielten.

Form II.

Die Entwicklung stimmt im wesentlichen mit der von Form I überein. Eine Verschiedenheit zeigte sich in der Verteilung des Luftmycels, welches nicht die Faltungen, sondern den Grund der schüsselförmigen Vertiefungen bedeckte und schwächer ausgebildet war.

Form III.

Am 5. Tage am Boden des Kölbchens festsitzende Kolonien. Am 10. Tage Flüssigkeit trübe, am Rande ein schwacher Ring von Pilzinseln. Am 15. Tage Ring mäßig stark und Flüssigkeitsoberfläche zur Hälfte von einer dunkelgrünen, feingekörnten Haut bedeckt, die nach weiteren 14 Tagen die Flüssigkeitsoberfläche völlig überzogen hatte.

Ring sowohl wie Haut bestanden aus Sproßzellen mit verdickter Wandung und intensiver Färbung. Zellen mit Fetttröpfchen erfüllt.

Nur ganz selten hatten sich aus den fast kugelförmigen Zellen Hyphen entwickelt, die auch immer nur eine mäßige Länge erreichten.

Kartoffelwasser.

Form I.

Am 5. Tage schwacher flockiger Bodensatz.

Nach 14 Tagen 2—3 frei schwimmende, lackartig glänzende und 2—3 an der Gefäßwand haftende Pilzinseln mit schleierartigen, farblosen Anhängen in der Flüssigkeit. Nach einem Monat Inseln stark gewachsen, von unregelmäßiger Gestalt und nur wenig aus der Flüssigkeit hervorragend. Ihre Zahl hatte zugenommen, so daß ein Drittel der Flüssigkeitsoberfläche bedeckt war.

Die Pilzinseln bestanden aus normalen Konidien und Mycel. Ring, Bodensatz und schleierartige Anhänge nur aus normalen Sproßzellen mit fein granuliertem Inhalt.

Form II.

In der ersten Woche gleichmäßiger, feinflockiger Absatz. Nach 14 Tagen setzte sich ein schwacher Ring an, der nach einem Monat eine Breite von 1 mm erreichte und aus runden, ovalen und langgestreckten Zellen bestand, die auch in größeren Verbänden vereinigt waren. Hyphen fanden sich nicht. Der Ring hatte ähnlich wie bei Form I schleierartige Anhänge, die nur aus gestreckt-ellipsoidischen Zellen bestanden, während sich im Bodensatz auch runde fanden.

Form III.

In den ersten 14 Tagen hatte sich nur ein schwacher, flockiger Absatz entwickelt. Nach 3 Wochen war ein leicht in der Flüssigkeit sich auflösender Ring mit schleierartigen Anhängen vorhanden; nach 1 Monat noch nicht geschlossen; Anhänge und Bodensatz ziemlich stark. Flüssigkeit trübe. Ring und Anhänge setzten sich nur aus runden Sproßzellen zusammen.

Gelbrübenwasser.

Form I.

Nach 10 Tagen Flüssigkeit trübe, an der Oberfläche 2 kleine, frei schwimmende Hautinseln; diese waren zunächst von Mycel bedeckt und infolgedessen grau gefärbt. Nach einem Monat hatten sie lackartig glänzende Oberfläche. Da nun Sproßzellen vorherrschten, war Luftmycel nur noch am Rande der Inselchen in einem ganz schmalen Streifen sichtbar. Der Wechsel im Aussehen der Hautinseln ist für Gelbrübenwasser charakteristisch. Ring 2—3 mm breit.

Nach 40 Tagen waren die Pilzinseln zu einer dicken, festen Haut von knorpeliger Beschaffenheit verwachsen. Ring sowohl wie Haut stellten ein stark verfilztes Gewebe von Mycel dar, worin zahlreiche ovale Konidien eingeschlossen waren.

Der Bodensatz bestand aus ovalen und langgestreckten Zellen. Verbände solcher waren nicht vorhanden.

Form II.

Am 10. Tage Flüssigkeit trübe, schwacher Bodensatz. Später gleiche Erscheinungen wie bei Form I, Hautinseln jedoch unregelmäßig und nicht zusammengeschlossen. Der 5 mm breite Ring sowie auch die Hautinseln zeigten den früher dargelegten anatomischen Aufbau. Im Bodensatz ovale und kugelförmige Sproßzellen einzeln und in größeren Verbänden. Selten auch langgestreckte Zellen.

Form III.

Am 10. Tage ganz schwacher Bodensatz. Erst nach 28 Tagen hatte sich ein schwacher Ring angesetzt, von welchem Schleier in die Flüssigkeit hinabhingen. Mit dem Ringe war ein auf der Flüssigkeit schwimmender Kreis von Pilzinseln lose verbunden. Letztere bestanden aus Mycel, runden und ovalen Konidien. Der Ring enthielt kein Mycel.

Krautwasser.

Form I.

Erst nach 20 Tagen sehr schwacher, an der Wandung des Kölbchens innerhalb der Nährflüssigkeit festsitzender Belag. Nach 1 Monat setzte mit einer schwachen Ringentwicklung das Oberflächenwachstum ein. Nach 40 Tagen auf der Flüssigkeit ungefähr 20 frei schwimmende kleine Hautinseln verteilt, die alle von Luftmycel bedeckt und infolgedessen blaßgrün gefärbt waren. Ebenso gefärbt war der fast nur aus runden und ovalen Zellen bestehende Ring; dieser ließ nur an einzelnen Stellen Hyphen erkennen. Die Abweichung in der Farbnuance scheint hier auf die chemische Zusammensetzung des Substrates zurückzuführen zu sein. (Vergl. auch Riesenkolonien.)

Im Bodensatz ovale, runde und langgestreckte Sproßzellen.

Form II.

Nach 20 Tagen schwacher Bodensatz von kleinen, braunen, zum Teil an der Glaswand festsitzenden, zum Teil losen Pilzrasen. Nach 1 Mo

nat schwacher, vielfach unterbrochener Ring. Der Ring enthielt ovale und runde Zellen und Zellverbände, außerdem nur wenig kümmerlich entwickeltes Mycel. Die Hyphen waren kaum länger als 10—12 gliedrige, einreihige Verbände von Sproßzellen. Der flockige Bodensatz bestand ausschließlich aus Verbänden von teils ovalen, teils langgestreckten Zellen, ähnlich wie das Luftmycel der Riesenkolonien dieses Pilzes auf Krautwassergelatine.

Form III.

In Krautwasser konnte trotz wiederholter Beimpfung der Nährflüssigkeit und Neuanlegung des Versuches kein Wachstum erzielt werden.

Milch.

Die äußeren Wachstumserscheinungen waren bei allen drei Organismen gleich: Nach 14 Tagen schwarze, eben sichtbare Kolonien am Boden des Kölbchens. Nach 1 Monat schwacher, brauner Ring und braune Hautinseln von 1—5 mm Durchmesser. Oberfläche der Hautinseln im allgemeinen gewölbt, in der zentralen Partie eingesenkt.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte einige unbedeutende Unterschiede. Bei Form I hingen häufig an einem Pol der Mutterzelle 5—6 Tochterzellen. Die Zellen hatten gedrungene Gestalt und waren einzeln fast farblos, in dichteren Haufen jedoch braun gefärbt.

Form II hatte gedrungene, eiförmige Zellen und stimmte bezüglich der Farbe mit Form I überein.

Form III hatte kugelförmige Zellen. Braunfärbung war schon bei einzeln liegenden Zellen erkennbar. Charakteristisch war das sehr häufige Auftreten von kugelförmigen Riesenzellen, deren Lumen eine große Vakuole erfüllte.

Durch das Wachstum dieser Pilze erlitt die Milch eine verhältnismäßig nur geringe Veränderung, jedenfalls trat keine Gerinnung ein. Es bildete sich am Boden des Kölbchens ein schwacher, weißer Absatz, und die Flüssigkeit war nicht mehr rein weiß, sondern hatte einen grauen Stich und war durchscheinend. Ausfallen von Kasein fand nicht statt.

Hefewasser.

Auch in Hefewasser waren die Zellen aller drei Formen braun gefärbt. Das ganze Wachstum bestand allenthalben nur in einem schwachen Bodensatz von ovalen Sproßzellen bei Form I, von kugelförmigen bei Form II und von ovalen bei Form III. Bei Form III waren außerdem häufig Riesenzellen mit großen Vakuolen vorhanden.

Alle drei Formen zeigten zahlreiche Gemmen.

Gehopfte Bierwürze mit Zusatz von Aethylalkohol.

Das Wachstum war langsamer als in Würze ohne Alkohol, in seinen Erscheinungen jedoch übereinstimmend. Bei den niederen Konzentrationen wie 1 und 2% fanden sich in den Zellen Fetttröpfchen in größerer Anzahl vor, bei 3 und 4% trat jedoch die Fettbildung zurück.

Etwas verschieden von Form I und II verhielt sich Form III, deren stärkste Entwicklung bei Zusatz von 4% Alkohol in Form einer stark gefalteten, aus kräftigem Mycel bestehenden Haut stattgefunden hatte, während bei den niederen Konzentrationen nur eine dünnere, aus den gleichen Elementen zusammengesetzte Haut vorhanden war. Die Zellen von Form III besaßen auch die größten Fetttröpfchen, durchwegs 2—4 in einer Zelle. Infolge ihrer gleichmäßigen Größe und der Art ihrer Lagerung sahen sie den Sporen der Saccharomyceten sehr ähnlich.

Hayducksche Nährlösung mit gleichzeitigem Zusatz von Pepton und Säuren.

In Peptonlösung, die im allgemeinen eine mäßig gute Nährlösung darstellt, traten auch bei Zusatz von verschiedenen organischen Säuren im großen und ganzen immer wieder die nämlichen bereits dargelegten Erscheinungen auf.

Im Laufe der Entwicklung entstanden ein zusammenhängender, aus flockigem Mycel bestehender Bodensatz und als Oberflächenvegetation schwimmende Pilzinseln, die sich in einzelnen Fällen zu einer geschlossenen Decke aneinander reihten. An der Gefäßwand setzten sich Pilzkolonien fest.

Bei gewissen Säuren zeigten sich regelmäßig auftretende Abweichungen von diesem allgemeinen Wachstumstyp, und es ergaben sich bei der mikroskopischen Untersuchung noch außer dem einzelne Verschiedenheiten, die hier kurz erwähnt werden sollen.

Bei Gegenwart von Apfelsäure waren die Wachstumserscheinungen normal, unter dem Mikroskope zeigte sich jedoch, daß besonders bei den niederen Konzentrationen die Größe der Sproßzellen und des Mycels bedeutend zugenommen hatte: Hyphen 3,2 μ breit, kugelförmige Zellen ca. 8 μ im Durchmesser, ovale Zellen 7 μ lang und 4 μ breit.

Bei den höheren Konzentrationen näherten sich die Zellen wieder der normalen Größe.

In zitronensäurehaltiger Nährlösung bildete Form I vorwiegend, bei 1 und 2% fast ausschließlich wurstförmige Zellen, die mit je einem stark lichtbrechenden Körperchen an jedem der beiden Pole den Zellen vom Mycoderma täuschend ähnlich sahen. Form II bildete an der Oberfläche der Pilzinseln Zotten. Im übrigen war Form II wie Form I normal gewachsen.

In Weinsäure nahmen die Zellen von Form I abweichend von der normalen gestreckt-ellipsoidischen Form gedrungene Gestalt an, Form II war normal, Form III entwickelte an der Oberfläche kleine Pilzrasen, die sich zu Ringen aneinander reihten.

In Bernsteinsäure entstanden auf den Pilzinseln von Form III starre, stachelartige Erhebungen, die unter dem Mikroskope als Zotten erkannt wurden.

In Milchsäure trat im wesentlichen normales Wachstum auf. Bei Form I entstanden aber häufig an einem Pol der Mutterzelle mehrere Tochterzellen, so daß eine der Kronenbildung

ähnliche Erscheinung zustande kam. (Vergl. Milch.)

Bei Form II und III war bei 2% nur ein schwacher körniger Absatz zu bemerken. Die sandkornähnlichen Gebilde stellten aus Sproßverbänden von kugelförmigen Zellen bestehende Pilzkolonien dar. Mycel kam hier nicht vor.

Hayducksche Nährlösung mit Zusatz von verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen.

Der Hayduckschen Nährlösung wurde in drei Versuchsreihen einmal Asparagin, dann Ammonsulfat und endlich Pepton in Mengen von je 2% als Stickstoffquelle beigefügt. Innerhalb einer jeden von diesen drei Reihen kamen dann wieder drei verschiedene Zucker, nämlich Dextrose, Saccharose und Maltose als Kohlenstoffquelle zur Anwendung, und zwar ebenfalls in Mengen von je 2%. Diese sterilen Nährlösungen wurden in Mengen von 50 ccm auf Erlenmeyerkölbchen verteilt, geimpft und bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Das Wachstum der drei Formen war im allgemeinen mäßig und gleichartiger Natur. Es erschien durch ein flockiges Bodenmycel, das in sich fest zusammenhing, gekennzeichnet. Außerdem trat bei den meisten Kulturen auch eine Oberflächenvegetation in Form von frei schwimmenden Pilzrasen auf, die oft auch an der Gefäßwand festsaßen. Sie trugen das bekannte Aussehen.

Als erwähnenswerte Abweichungen wären anzuführen: Das Fehlen einer Oberflächenvegeta-

tion in den Lösungen mit Peptonzusatz. Ferner bildete Form II in der Nährlösung mit Asparagin + Dextrose Pilzrasen mit stachelartigen Erhebungen (Zotten) und an der Oberfläche der Lösungen mit Ammonsulfat + Dextrose ganz kleine Pilzrasen, die sich zu Ringen aneinander reihten.

Andere geringfügige Verschiedenheiten haben für die Diagnose keine Bedeutung.

Die in den verschiedenen Versuchsreihen verwendeten Nährlösungen erwiesen sich für die Entwicklung der drei Formen von sogenannten schwarzen Hefen nicht gleichwertig. Würze und einzelne Pflanzensäfte eignen sich für die Kultur der Pilzformen sehr gut, Milch, Hefewasser und mineralische Nährlösungen dagegen weniger. Nach den Wachstumserscheinungen in den einzelnen Kulturen können die Nährflüssigkeiten in zwei Gruppen geteilt werden. Die erste umfaßt: Würze, Pflanzensäfte, Milch und Hefewasser, die zweite: mineralische Nährlösungen mit verschiedenen Zusätzen.

Für die erste Gruppe ist ein aus Sproßzellen bestehender Bodensatz und eine kräftige Oberflächenvegetation, die durch Verfilzung von anfangs isolierten kleinen Pilzrasen entsteht und in günstigen Nährlösungen in Form einer völlig geschlossenen Haut ihren Höhepunkt erreicht, charakteristisch. Die Zusammensetzung der Haut aus Hyphen und Sproßzellen wechselt mit der Nährlösung.

Anders die zweite Gruppe: Oberflächenvegetation fehlt entweder ganz oder die Pilzinseln, die mitunter sogar sehr kräftig entwickelt sind, tre-

ten niemals miteinander in Verbindung, sondern sinken in der Regel selbst bei leichter Erschütterung der Kultur zu Boden. Der Bodensatz besteht aus flockigem, voluminösem Mycel.

Die Zusammensetzung der Nährlösung bedingt überdies noch eine verschiedene Färbung der Organismen. In Würze bei Tageslicht und im Dunkeln und bei verschiedenen Temperaturen dunkelgrün, in Krautwasser blaßgrün, in Milch und Hefewasser braun, in Hefewasser bei niederer Temperatur farblos.

Für die Unterscheidung der einzelnen Pilzformen bieten die äußeren Wachstumserscheinungen in den verschiedenen Nährflüssigkeiten verhältnismäßig nur geringe Anhaltspunkte. Der konstanteste Unterschied in sämtlichen Nährlösungen ist in der Form der Sproßzellen zu finden. Aehnlich wie in den Tröpfchenkulturen sind jene bei Form I immer gestreckt-ellipsoidisch und isoliert, bei Form II meist eiförmig und in langen Verbänden vereinigt, bei Form III kugelförmig und, abgesehen von vereinzelten Verbänden, voneinander getrennt.

Für Form III ist das Auftreten von kugelförmigen Riesenzellen mit großen Vakuolen in Milch und Hefewasser charakteristisch.

Wachstum auf festen Nährböden.

a) Einzellkulturen.

Die Kulturen wurden nach dem von Wichmann-Zikes[11]) angegebenen Tröpfchenplattenverfahren angelegt. Es wird auf das geteilte Deck-

glas eine dünne Schicht verflüssigter Gelatine aufgetragen und auf diese nach dem Erstarren mittels einer Kapillarröhre eine Tröpfchenkultur angelegt. Man erreicht dadurch, daß die ausgesäten Zellen in dem engbegrenzten Raum des Tröpfchens und außerdem nur in einer Ebene, d. i. an der Oberfläche der Gelatine zu liegen kommen. Dadurch wird das Absuchen der Platten, das wegen des geringen Unterschiedes im Lichtbrechungsvermögen zwischen Gelatine und Hefezelle an sich schon schwierig ist, bedeutend erleichtert.

H. Will[12]) ordnet die auf festen Nährböden entstehenden Formen der Kolonien drei Typen unter: 1. regelmäßige, 2. regelmäßige mit teilweise unregelmäßigem Rand, 3. völlig unregelmäßige.

Form I.

Die Sprossung vollzieht sich in der gleichen Weise wie im Tröpfchen. Die Zellen lösen sich zunächst aus dem Verbande, liegen einzeln und bilden dann Kolonien vom Typus 1.

Die Entwicklung von Hyphen tritt erst nach 6—8 Wochen ein und ist auch dann nur selten zu beobachten. Einen Einfluß auf die Formgestaltung der Kolonien üben jene nicht aus. An den Hyphen entstehen wie in den Tröpfchen Konidien, meist 2—4 nebeneinander. Größere Ansammlungen von Konidien traten an den Hyphen nicht auf.

Form II.

Die Sprossung der eingesäten Konidien erfolgt in Reihen mit seitlichen Abzweigungen. Diese sind wie in der Tröpfchenkultur in einem

Winkel von ungefähr 60° der Zelle seitlich angesetzt. In einem späteren Stadium stellen die Kolonien einen im allgemeinen runden Zellhaufen dar, von welchem nach allen Seiten hin einreihige Sproßverbände ausstrahlen. Anfangs Typus 1, später Typus 2.

Während in der ersten Zeit ausschließlich Sproßzellen entstanden, kam es im 2. Monat auch zur Entwicklung von Hyphen, die von dem mehr oder weniger kreisförmigen Kern der im übrigen unregelmäßigen Kolonie in radialer Richtung weit über den Rand des Kernes der Kolonie ausstrahlten.

In gewissen Abständen erzeugten sie runde oder sternförmige Anhäufungen von Konidien, aus welchen nicht selten unmittelbar wieder Hyphen hervorwuchsen (Fig. 5).

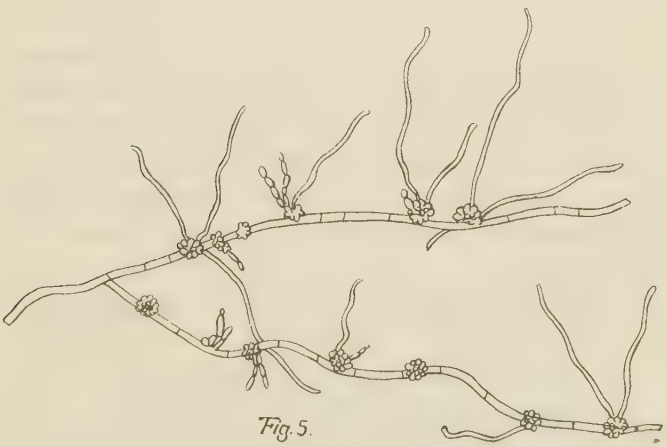

Fig. 5 Form II. Mycel mit Gruppen von Konidien, die teilweise zu Hyphen ausgewachsen sind. Tröpfchenplattenkulturen nach Wichmann-Zikes mit Würzegelatine. 500:1.

Form III.

Anfangs kleine Sproßverbände von runden Zellen, aus welchen sich dann unregelmäßige Zellhaufen entwickeln, die zwischen Typus 1 und 2 stehen. Die Kolonien bestehen aus einem dichteren Kern mit unregelmäßiger Randlinie. Die meisten Kolonien, besonders aber die am Rande der Gelatine gelegenen, erzeugen Hyphen, die in radialer Richtung weit über den dichteren Kern hinauswachsen. Die Verteilung der Hyphen ist keine regelmäßige, sondern die dem Rande der Gelatine nahe gelegenen Kolonien erzeugen ganz besonders an der der Peripherie des Gelatinebelages zugekehrten Seite auffallend mehr Hyphen. Auch hier tragen die Hyphen in nicht sehr großen Abständen Gruppen von fast immer sternförmig angeordneten Konidien, die häufig gleich wieder zu Hyphen auswachsen. Es bietet sich also bei der vorliegenden Form das gleiche Bild wie bei Form II.

Bei der Einzellkultur auf festen Nährböden wiederholen sich also bei den einzelnen Organismen die Bilder, die wir bereits bei der Tröpfchenkultur kennen gelernt haben. Die in jedem einzelnen Falle beobachteten Erscheinungen erhalten aber dadurch das Gepräge von unterscheidenden Merkmalen:

Form I: Sofortige Trennung von Tochter- und Mutterzelle.

Form II: Verzweigte Sproßverbände von festerem Zusammenhalt.

Form III: Sproßverbände selten und nur 3—4 Glieder.

Mycelbildung war am stärksten bei Form II, schwächer bei III, am schwächsten bei I. Wachstumsform bei I Typus 1, bei II anfangs Typus 1, später 2, bei III zwischen Typus 1 und 2.

*b) Riesenkolonien.**)

Ein weiteres Mittel zur Gewinnung von unterscheidenden Merkmalen für die Sproßpilze im weitesten Sinne und auch für andere Pilze besitzen wir in den Wachstumserscheinungen der Riesenkolonien. Nach allen bis jetzt vorliegenden Erfahrungen sind jene unter den gleichen Verhältnissen auf den gleichen Nährböden und bei gleicher Temperatur konstant. Allerdings treten auf verschiedenen Nährböden Variationen auf. So verschiedenartig aber in einzelnen Fällen die Wachstumsform der gleichen Art auf verschiedenen Nährböden zu sein scheint, so wird sie doch von demselben Wachstumsgesetz beherrscht. Es handelt sich nicht um prinzipielle, sondern nur um graduelle Verschiedenheiten.[13]) Sie gewähren außerdem noch den großen Vorteil, daß sie durch photographische Aufnahme in exakter Weise festzulegen sind.

Um die Verschiedenheiten zwischen den Riesenkolonien der drei Organismen zu erkennen, ist notwendig, die Kulturen gleichzeitig anzulegen und in gleichen Altersstufen zu kontrollieren, da einzelne Erscheinungen sehr vergänglicher Natur sind. Aeltere Riesenkolonien verschiedener Pilze sehen sich häufig ähnlich, während sie zur Zeit

*) Hiezu Tafel II.

ihrer ersten Entwicklung auffallende Verschiedenheiten aufweisen. Ein für die Differenzierung wichtiges Merkmal, das für den ganzen Versuch von grundlegender Bedeutung ist, liegt, ähnlich wie bei den Flüssigkeitskulturen, in der größeren oder geringeren Neigung zur Mycelbildung, die dann auch schon in der äußeren Erscheinung der Riesenkolonie scharf zum Ausdruck kommt.

In der folgenden vergleichenden Uebersicht sind nur in dem Falle die bei der Vergleichung der verschiedenen Altersstufen gemachten Beobachtungen verzeichnet, wenn sich gegenüber der vorhergehenden Veränderungen geltend machten. Es enthält somit jeder Abschnitt eine kurze Beschreibung der Entwicklung und schließt mit den Ergebnissen der makro- und mikroskopischen Untersuchung der Kolonie nach Abschluß des Versuches, der sich mindestens auf 1 Monat, in einzelnen Fällen auch auf 2 Monate erstreckte.

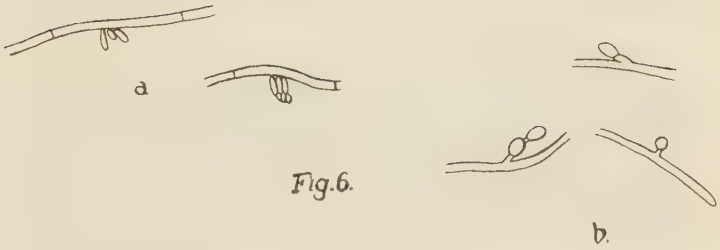

Fig. 6 Form I. a) Hyphen mit Konidien; b) auf kurzem Seitenast der Hyphe sitzende Konidien. Luftmycel von Riesenkolonien auf Würzegelatine. 500:1

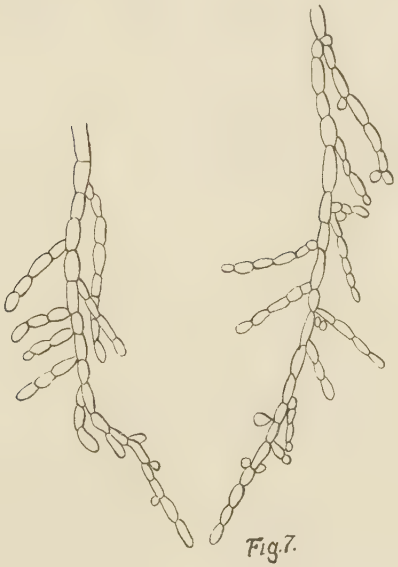

Fig. 7 Form II. Sproßmycel unterhalb einer Riesenkolonie auf Würzegelatine. 500 : 1.

Form I.

Am 4. Tage grünlich-schwarzer, nicht glänzender, glatter Belag; nach 8 Tagen Oberfläche des Belages gekörnt; nach 14 Tagen stellenweise lückenhafter, graugrüner, langhaariger Pelz an der Oberfläche. Belag unregelmäßig gefaltet.

Pelz: Luftmycel in Bündeln angeordnet. An den Hyphen Konidien auf kurzem Mycelast sitzend (Fig. 6).

Zellform der Hauptschicht des Belages verschieden, Sproßzellen vorherrschend, Gemmen häufig.

Unter der zentralen Partie zahlreiche in spiraligen Windungen nach abwärts in die Gelatine wachsende Hyphen, welche in den tieferen Partien der Gelatine einzelnstehende Konidien, in den höheren größere Anhäufungen von solchen tragen.

Form II.

Am 4. Tage grünlich-schwarzer, gefalteter, samtartiger Belag; nach 14 Tagen unregelmäßig verlaufende wellenförmige Faltungen auf der Oberfläche; nach 30 Tagen radiale Falten an den peripheren Enden gegabelt.

Pelz: Luftmyel steril und von gewöhnlichem Aussehen. Zellform der Hauptschicht des Belages verschieden. Sproßzellen vorherrschend, Gemmen häufig. Gelatine von verzweigten Verbänden langgestreckter Sproßzellen durchwachsen (Figur 7). Hyphen in der Gelatine nur vereinzelnt.

Würzegelatine.

Form III.

Nach 8 Tagen schwarzer, an der Oberfläche fein gekörnter, matter Belag; nach 14 Tagen gekröseartig gefaltet; nach 30 Tagen schwacher Anflug von Luftmycel. Die einzelnen Hyphen ungleichmäßig dick und stark gebogen.

Verschiedene Zellformen, Gemmenbildung. In der Hauptschicht Sproßzellen vorherrschend.

Gelatine von verzweigten Verbänden langgestreckter Zellen durchwachsen (Figur 7).

Vergleichung.

Unterschied: Oberfläche der jungen Kolonie: bei Form I glatt, Form II samtartig glänzend (Luftmycel), Form III gekörnt.

Oberfläche der älteren Kolonie bei Form II radial, bei Form I und III unregelmäßig gefaltet.

Charakteristisch für Form III ungleichmäßig dicke Hyphen des Luftmycels.

Ungehopfte

Form I.	Form II.
Belag nach 1 Monat 5 mm dick und in der Mitte eingesenkt. Die glatte Oberfläche von kurzhaarigem grünen Mycel bedeckt und von samtartigem Charakter. Hyphen dicht in Bündeln beisammenstehend (Zotten) und steril. Dunkle (obere) und hellgrüne (untere) Schicht des Belages aus Sproßzellen und Mycel zusammengesetzt. Stark gewundene sterile Hyphen unter der zentralen Partie innerhalb der Gelatine.	Belag nach 1 Monat 1—2 mm dick. Oberfläche mit unregelmäßig verlaufenden gekröseartigen Falten und von wolligem Pelz bedeckt. Im übrigen wie Form I.

Kartoffelwasser

Form I.	Form II
Am 4. Tage grünlich schwarz, lackartig glänzend; nach 14 Tagen von grauweißem pelzartigem Luftmycel bedeckt. Luftmycel aus einreihigen Sproßverbänden; nach 1 Monat Pelz verschwunden. Oberfläche glatt, rußschwarz und feucht. Dunkle (obere) Schicht des Belages aus ovalen Sproßzellen bestehend. Gelatine von geraden und spiralig gewundenen Hyphen, an welchen sich kugelförmige Haufen von Konidien entwickelt hatten, durchwachsen.	Am 4. Tage grünlich-schwarzer, lackartig glänzender, glatter Belag; nach 14 Tagen gekröseartig gefaltet, nur die höchsten Erhebungen der Falten von spärlichem Luftmycel bedeckt. Mycel kurzgliedrig (Sproßmycel) und unverzweigt (Figur 8). Dunkle (obere) Schicht des Belages aus kugelförmigen Sproßzellen mit starker Wand und großen, fast das ganze Lumen ausfüllenden Vakuolen. Charakteristisch sind große runde Riesenzellen. Wachstum in der Gelatine nicht vorhanden.

Würzegelatine.

Form III.	Vergleichung.
Belag nach 1 Monat in der zentralen Partie stark gefaltet und von mausgrauem, wolligem Mycel bedeckt. Hyphen häufig mit Anschwellungen und von kümmerlichem Aussehen. Sie tragen vereinzelnte gedrungene Konidien, oft endständig. Randpartie der Kolonie schwach gefaltet und fast ohne Luftmycel. Hauptschicht: verschieden geformte Sproßzellen und Hyphen. Gelatine von spiralig gewundenen Hyphen, die einzelne oder in kleinen Gruppen stehende Konidien tragen, durchwachsen.	Form I unterscheidet sich von den beiden anderen durch die Höhe des Oberflächenbelages und durch den samtartigen Glanz des Luftmycels, das bei den anderen beiden Formen wolligen Charakter (Pelz) hat.

Gelatine.

Form III.	Vergleichung.
Am 4. Tage glatter, nicht glänzender Belag; nach 14 Tagen Oberfläche fein gekörnt und vorübergehend einige weiße Flecken von Luftmycel. Nach 1 Monat am Rand der Kolonie konzentrische Ringe mit gekörnter Oberfläche. Belag aus runden starkwandigen Sproßzellen, außerdem auch ovale. In der Gelatine spiralig gewundene Zellfäden, die ungleichmäßig dick und verzweigt sind. Endständige Konidien.	Junge Kolonie bei Form I und II lackartig glänzend, bei Form III matt. Später Form I schwach gefaltet, Form II stark gefaltet, Form III gekörnt. Bleibendes Luftmycel nur bei Form II auf den Falten. Vorübergehendes bei Form I als weißgrauer Pelz, bei Form III als weiße Flecken. Bei Form III ungleichmäßig dicke Hyphen in der Gelatine.

Gelbrübenwasser-

Form I.	Form II.
Nach 8 Tagen Riesenkolonie mit prächtiger, grüner, durch Luftmycelentwicklung samtartiger Oberfläche; nach 1 Monat Kolonie stark aufgewölbt (ca. 5 mm) und von langhaarigem, grauem Pelz bedeckt. Luftmycel in Bündeln (Zotten) angeordnet (Figur 9). Belag aus 2 Schichten: dunkle (obere) und helle (untere), aus Sproßzellen und Mycel zusammengesetzt. Hyphen in der Gelatine mit einzelnen Konidien und kleinen Gruppen von solchen.	Die ganze Entwicklung und Beschaffenheit der Riesenkolonie stimmt mit der von Form I überein und unterscheidet sich nur dadurch, daß der Belag der 4 Wochen alten Kolonie flach ausgebreitet ist und zahlreiche kleine Falten zeigt. Die Sproßzellen in der dunklen (oberen) Schicht sind zumeist einreihigen Verbänden von 6—10 Gliedern vereinigt.

Krautwasser-

Form I.	Form II.
Trotz wiederholter Impfung kein Wachstum.	Nach 1 Monat hoch aufgewölbter Belag mit warzenartigen Erhebungen (Maulbeerform) und samtartigem Luftmycel aus unverzweigten Verbänden von Sproßzellen; nach weiteren 14 Tagen zentrale Partie braunviolett, Rand spangrün. Dunkle (obere) Schicht des Belages aus runden Sproßzellen, helle (untere) Schicht aus regelmäßig und unregelmäßig gestalteten langgestreckten Zellen und aus Mycel zusammengesetzt.

Gelatine.

Form III.	Vergleichung.
Nach 8 Tagen schwarzer Belag mit feinen radialen Falten; nach 1 Monat zentrale und Randpartie hellgrün. Dazwischen liegende Ringzone dunkelgrün. Belag mäßig stark und gewölbt. Luftmycel von kümmerlichem Aussehen. Dunkle (obere) und helle (untere) Schicht des Belages aus verschiedenen Formen von Sproßzellen bestehend. Hyphen in der Gelatine stark spiralig gewunden und ungleichmäßig dick, vielfach verzweigt und oft mit endständigen Konidien.	Form I und II zeigen inbezug auf Form der Kolonie die nämlichen Verschiedenheiten wie auf ungehopfter Würze. Form I stark in die Höhe gewachsen. Form II flach ausgebreitet. Form III steht mit einem mäßig gewölbten Belag zwischen Form I und II und zeigt auch hier unregelmäßige Anschwellungen der Hyphen in der Gelatine.

Gelatine.

Form III.	Vergleichung.
Nach 1 Monat wie Form II. Dunkle (obere) und helle (untere) Schicht des Belages aus runden Sproßzellen bestehend. Keine Hyphen in der Gelatine.	Das Wachstum von Form II und III ist im allgemeinen gleich. Die warzenartigen Erhebungen sind jedoch bei Form II größer.

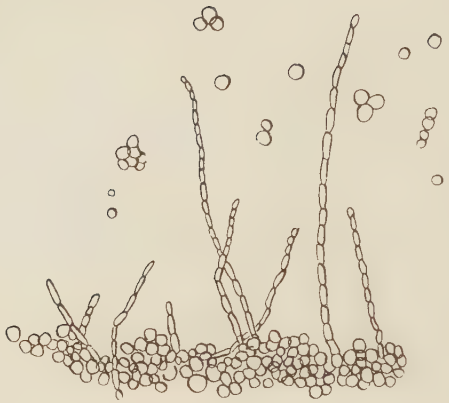

Fig. 8

Fig. 8 Form II. Luftmycel aus Sproßverbänden bestehend. Kugelförmige Sproßzellen. Riesenkolonie auf Kartoffelwassergelatine. 500 : 1.

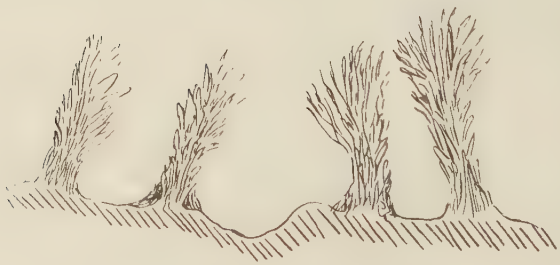

Fig. 9.

Fig. 9 Form II. Luftmycel der Riesenkolonie auf Gelbrübenwassergelatine. Hyphen zu Bündeln vereinigt. ca. 180 : 1.

Wie aus der Beschreibung und den photographischen Bildern (vgl. Taf. I) hervorgeht, haben die Riesenkolonien der sogenannten schwarzen Hefen durchaus keine Aehnlichkeit mit jenen der Saccharomyceten, Torulaceen und Mycodermen. Der pelzartige Ueberzug und die groben Faltungen verleihen ihnen vielmehr ein ähnliches Aussehen wie jenes von gewissen Schimmelpilzen, z. B. Penicillium. Es trifft dies besonders für die Kolonien auf jenen Nährböden zu, auf welchen eine starke Hyphenentwicklung stattfindet, also für die günstig zusammengesetzten.

Von den einzelnen Nährböden ist ungehopfte Würzegelatine am geeignetsten. Dann folgen der Reihe nach gehopfte Würze-, Gelbrübenwasser-, Kartoffelwasser- und Krautwassergelatine. Die Mycelentwicklung und Faltenbildung ist ebenfalls in diesem Sinne abgestuft. Die Faltenbildung tritt bei Form III schon auf Gelbrübenwassergelatine zurück und in noch höherem Grade auf Kartoffelwassergelatine. Auf Krautwassergelatine kamen sowohl bei Form II wie bei Form III als Ausdruck eines stärkeren lokalen Wachstums der Oberfläche der Kolonie größere und kleinere Höckerchen zum Vorschein, die nicht mehr in Faltenbildung übergehen.

Betrachtet man die Riesenkolonien der einzelnen Formen auf den verschiedenen Nährböden, so möchte es den Anschein gewinnen, daß besonders bei Krautwasser- und Kartoffelwassergelatine prinzipielle Unterschiede zur Geltung kämen. Die Entwicklungsgeschichte der Kolonien zeigt jedoch, daß es sich nicht um prinzipielle, son-

dern nur um graduelle Unterschiede handelt, die in der oben schon berührten mehr oder weniger günstigen Zusammensetzung des Nährbodens ihren Grund haben. Die Riesenkolonien auf Krautwasser- und Kartoffelwassergelatine scheinen hiedurch als in der Entwicklung zurückgeblieben.

Zur Charakteristik der Riesenkolonien möge noch hervorgehoben sein, daß Form II auf den gleichen Nährböden stets ein größeres Flächenwachstum und damit im Zusammenhang stehend eine stärkere Faltenbildung als Form I und III aufweist.

Physiologie.

Generationsdauer.

Die Generationsdauer gibt die Zeit an, die zur völligen Entwicklung einer neuen Sproßzelle notwendig ist. Sie wurde für die Sproßgeneration der Konidien ermittelt, und zwar nach Hoyer.[14])

Die nach 3—4 Tagen in gehopfter Würze entwickelte Sproßgeneration, welche aus eingeimpften Konidien hervorgegangen war und sich in lebhafter Vermehrung befand, wurde in frischer Nährflüssigkeit verteilt. Die Mischung diente zur Anfertigung von Adhäsionskulturen nach P. Lindner, und zwar auf geteilten Deckgläsern nach Will. Jene Felder der verwendeten Deckgläser, in welchen sich bloß eine Zelle befand, wurden markiert und die Kulturen zu 25° gestellt. Nach 20 Stunden wurden die aus einer solchen Zelle entstandenen neuen gezählt.

Die Generationsdauer wurde nach der auch von Pedersen[15]) benützten Formel berechnet:

$$M = 2^{\frac{t}{x}} \qquad \frac{t}{x} = \frac{\log M}{\log 2}$$

wobei: M = Zahl der neu entstandenen Zellen, t = Wachszeit, x = Generationsdauer.

Für ein exaktes Ergebnis müssen vor allem zwei Bedingungen erfüllt sein:

1. muß die Sprossung des Organismus eine 2 teilige und nicht etwa eine 3- oder 4 teilige sein. Dies ist bei den Konidien der schwarzen Hefen tatsächlich der Fall;

2. müssen die zur Anfertigung der Adhäsionskultur benützten Zellen sich schon in lebhafter Sprossung befinden. Bei Aussaat von ruhenden Zellen würde die Zeit, welche zur Vorbereitung für die erste Sprossung innerhalb der Zelle notwendig ist, mitgerechnet werden und sich hieraus eine zu lange Generationsdauer ergeben.

	Temperatur	Anzahl der nach 20 Stunden gewachsenen Zellen	Im Durchschnitt aus einer Zelle entstanden	Generationsdauer
I.	25°	14. 13. 17. 16. 17. 15. 17. 17. 18. 17. 13. 12. 11. 14. 15. 16. 14. 15. 16. 14. 15. 14. 13.	14,8	5 Std. 8 Min.
II.	25	17 17. 20. 21. 16. 14. 16. 19. 15. 18. 17. 16. 20 usw. 45 Zählungen	17,8	4 Std. 48 Min.
III.	25	5. 5. 4. 4. 4. 7. 5. 7. 4. 9. 6. 8. 7. 5. 6. 6. 4. 6. usw. 36 Zählungen	5,4	8 Std. 13 Min.

Form III erweist sich also auch hinsichtlich der Generationsdauer bei Vermehrung der Konidien durch Sprossung als etwas verschieden von

den beiden anderen Formen. Die Generationsdauer ist mit 8 Stunden und 13 Minuten die längste. Die kürzeste Generationsdauer hat sich mit 4 Stunden 48 Minuten bei Form II ergeben. Form I steht mit 5 Stunden 8 Minuten zwischen Form II und III.

Einfluss verschiedener Temperaturen.

Das Verhalten gegenüber hohen, sowie gegenüber niedrigen Temperaturen kann unter Umständen für die Differenzierung von Sproßpilzen wertvolle Anhaltspunkte geben.

Zweck der folgenden Untersuchung war Feststellung

1. der Grenztemperaturen beim Erhitzen in Flüssigkeit;
2. der Grenztemperaturen für die Vermehrung in Flüssigkeit.

ad 1. Reagenzröhrchen wurden mit 10 ccm gehopfter Bierwürze beschickt, mit Watte verschlossen und mit dem betreffenden Pilz geimpft. Das Aussaatmaterial stammte aus einer 3 Wochen alten Kultur in Würze. Eine alte Kultur wurde aus dem Grunde verwendet, weil diese zahlreiche Gemmen enthielt, welche voraussichtlich gegen Temperatureinwirkung widerstandsfähiger sind. Die Reagenzröhrchen wurden hierauf in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur gebracht und 30 Minuten lang bei dieser Temperatur belassen. Nach dieser Zeit wurden die Röhrchen bei Zimmertemperatur zur Beobachtung aufgestellt. Die angewendeten Temperaturen lagen zwischen 40 und 60°, und zwar von 5 zu 5 Grad ansteigend.

Der Versuch zeigte, daß durch eine Temperatur von 50 Grad unter den eingehaltenen Bedingungen jedes Wachstum unterdrückt wird, während bei 45 Grad nach 8 tägiger Beobachtungszeit ein kräftiges Wachstum bemerkbar war. Bei 48 Grad, für welche Temperatur noch nachträglich ein Versuch angelegt wurde, ergab sich, daß unter den nämlichen Bedingungen wohl noch eine Entwicklung eintritt, die jedoch in ihrem ersten Stadium eine bedeutende Verzögerung erfährt.

ad 2. Die höchste Temperatur, bei welcher noch Vermehrung eintritt, wurde derart ermittelt, daß mit 10 ccm Bierwürze beschickte Freudenreichkölbchen mit zwei Platinösen aus dem Bodensatz einer in Bierwürze herangezüchteten Kultur geimpft und in einem Thermostaten aufgestellt wurden. Es wurde bei 30 Grad begonnen. Machte sich eine Entwicklung bemerkbar, so wurde die Temperatur um 1 Grad erhöht und ein neuer Versuch durchgeführt. Die Kulturen blieben 20 bis 30 Tage stehen. Die obere Grenztemperatur für die Vermehrung lag bei 35^0 C.

Die tiefste Temperatur, die noch eine Vermehrung gestattet, konnte nicht bestimmt werden, da bei Aufstellung von Kulturen im Hopfenkonservierungsraum einer Brauerei, dessen Temperatur von 0—2 Grad schwankt, noch eine schwache Vermehrung eintrat, tiefere Temperaturen aber nicht zur Verfügung standen. Bei den Temperaturen 0—2 Grad war die Farbstoffbildung sehr mangelhaft. Die Zellen erschienen unter dem Mikroskope selbst in größeren Haufen fast ganz farblos. Dieselbe Erscheinung trat bei einer in

Hefewasser bei niederer Temperatur herangezüchteten Kultur auf, während bei gewöhnlicher Temperatur in Hefewasser eine deutliche Braunfärbung eintritt.

Das schwache Wachstum und die reduzierte Farbstoffbildung deuten jedenfalls darauf hin, daß diese Temperatur der Grenze sehr nahe liegt.

Verschiedenes Verhalten der einzelnen Pilze konnte bei diesen Versuchen nicht festgestellt werden.

Verhalten gegenüber Aethylalkohol.

Der Versuch bezweckte, diejenigen Mengen von Alkohol ausfindig zu machen, bei welchen unter Anwendung von Würze als Nährlösung noch eine Vermehrung stattfindet. Bierwürze hatte sich schon bei verschiedenen Versuchen als günstiger Nährboden für alle drei Pilzformen erwiesen. Sie wurde sterilisiert und mit 1, 2, 3 usw. bis 12 Volumprozenten Alkohol versetzt. Um den Zusatz genau bemessen zu können, wurden immer größere Mengen (500 ccm) hergestellt, auf sterile Freudenreichkölbchen verteilt und geimpft. Bei allen drei Organismen fand während einer Beobachtungszeit von 12 Tagen bei Zimmertemperatur bis zu 4% Alkoholzusatz ein Wachstum statt, während die Kölbchen mit 5% mehrere Wochen hindurch steril blieben. Die beim Wachstum beobachteten äußeren Erscheinungen sind bereits im ersten Teile näher besprochen worden.

Um nun außer der Grenzkonzentration für die Entwicklungsfähigkeit auch noch jene zu bestimmen, bei welcher unter den gegebenen Ver-

hältnissen eine völlige Abtötung der Organismen erfolgt, wurde die alkoholhaltige Bierwürze abgegossen und durch frische Würze ohne Alkohol ersetzt. Waren noch lebensfähige Zellen im Bodensatz, so kam es nachträglich in der Bierwürze zu einem kräftigen Wachstum. Als Grenze, bei welcher die Abtötung der Einsaat unter den gegebenen Verhältnissen erfolgt, wurden 11% Alkohol gefunden.

Verhalten gegenüber organischen Säuren.

Die Versuchsanstellung über die Einwirkung von organischen Säuren auf die Vermehrungsfähigkeit und die Wachstumsformen ging von verschiedenen Gesichtspunkten aus.

In erster Linie sollte ermittelt werden, bei welcher Konzentration der angewendeten Säure unter den gegebenen Bedingungen noch ein Wachstum stattfindet. Bekanntlich[18]) verhalten sich in dieser Hinsicht verschiedene Sproßpilze verschieden und bietet ihr Verhalten gegenüber organischen Säuren brauchbare Unterscheidungsmerkmale. Ferner wurde untersucht, ob durch den Einfluß von bestimmten Säuren das Auftreten von charakteristischen Erscheinungen bedingt wird und ob diese für alle drei Pilze gemeinsam sind.

Endlich sollten die Versuche noch zeigen, ob die Pilze die Fähigkeit besitzen, Säure aus der Nährlösung zu assimilieren. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß durch deren Lebenstätigkeit selbst Säuren erzeugt werden können.

Zwecks Lösung dieser drei Fragen wurde der Versuch in folgender Weise angelegt.

Als Kulturflüssigkeit wurde mineralische Nährlösung nach Hayduck mit Peptonzusatz als Stickstoffquelle gewählt. Wie sich später herausstellte, ist allerdings Pepton eine wenig günstige Stickstoffquelle für die drei Pilze. Von Säuren kamen Apfelsäure, Zitronen-, Wein-, Bernstein-, Milch- und Essigsäure zur Anwendung. Die entsprechende Säuremenge wurde nun so bemessen, daß man die Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 3, 4, 5% mit annähernder Genauigkeit erreichte. Hierauf wurde die Nährlösung in Mengen von 100 ccm auf Pasteurkölbchen abgefüllt und im Dampftopf sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde der genaue Säuregehalt für jede Konzentration in Probekölbchen durch Titrieren von 5 ccm der Nährlösung mit $^{n}/_{10}$ NaOH festgestellt. Indikator Phenolphtalein.

Für die in der Regel schädliche Essigsäure wurden die Konzentrationen von 0,25, 0,5, 1 und 2% gewählt.

Die so vorbereiteten Kölbchen wurden mit je 3 Platinösen aus dem Bodensatz einer 8 Tage alten Würzekultur geimpft, bei durchschnittlich 17° C (Kellerraum) aufgestellt und nach 6 Wochen untersucht.

Ueber den Einfluß der Säuren auf die Wachstumserscheinungen wurde bereits bei den Kulturen in größeren Mengen von Nährflüssigkeit berichtet (siehe Seite 35).

An dieser Stelle sollen bloß die Beobachtun-

gen über den Grenzwert für die Vermehrung und über die Säureverzehrung behandelt werden.

Folgende Tabelle enthält in Prozenten ausgedrückt die Konzentrationen, bei welchen während einer Beobachtungszeit von 6 Wochen gerade noch deutliche Anzeichen von Wachstum zu verzeichnen waren.

	Apfelsäure	Zitronensäure	Weinsäure	Bernst.-säure	Milchsäure	Essigsäure
I.	4	4	2	2	1	—
II.	5	5	2	3	2	—
III.	5	5	2	3	2	—

Bei Zusatz von Essigsäure in den gewählten Konzentrationen trat überhaupt kein Wachstum auf. Die Grenzwerte für die Entwicklungsfähigkeit sind also bei Form II und III die gleichen. Form I ist etwas empfindlicher, und die Grenzwerte liegen durchschnittlich um 1 % niedriger als bei Form II und III.

Um eine etwaige Aenderung in der Säurekonzentration zu erkennen, wurde bei Abschluß des Versuches nach ca. 6 Wochen der Inhalt jedes Kölbchens bei der Untersuchung in einen 200 ccm Meßkolben gespült und zur Marke aufgefüllt. 10 ccm davon wurden mit $^{n}/_{10}$ NaOH titriert. Zur Titration wurden von jedem Pilze von je einer Säure 3 Konzentrationen gewählt, und zwar jene, bei welchen das kräftigste Wachstum stattgefunden hatte.

Die nachstehende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Titration vor der Beimpfung des Kölbchens und nach dem Wachstum. Die Zahlen bedeuten verbrauchte Kubikzentimeter $^{n}/_{10}$ NaOH.

	Apfelsäure			Zitronensäure			Weinsäure			Bernsteinsäure			Milchsäure		
Konzentration in Prozenten	0,5	1	2	0,5	1	2	0.5	1	2	0.5	1	2	0,5	1	2
Konzentration. Ausgedrückt in n/10 NaOH auf 5 ccm	12,4	15,9	22,3	11,7	15,8	23,0	11,7	13,1	17,3	12,6	17,0	25,2	11,1	14.0	19,9
I.	12,6	15,5	22,1	11,6	15,5	22,4	11,9	12,9	17.0	12.4	17,3	25,2	10,8	13,9	—
II.	12,6	15,6	22,3	11,6	16,1	22.6	11,4	12,8	17.2	12,6	17,0	25.3	11,2	14,0	19.9
III.	12,2	15,5	22,5	11,4	15,8	23,1	11,5	12,9	17,1	11.0	15,2	24,2	11.0	13,9	19,8

Nachdem sich die Werte der Säurekonzentration im allgemeinen innerhalb der Fehlergrenzen bei der Titrierung halten, darf geschlossen werden, daß eine Assimilierung der geprüften Säuren durch die drei Organismen nicht stattfindet. Nur für Bernsteinsäure liegt, und zwar ausschließlich für Form III, eine Abweichung vor, insoferne als die Unterschiede zwischen der Azidität der ursprünglichen Nährlösung und derjenigen nach ca. sechswöchentlicher Versuchsdauer weit über die zulässige Fehlergrenze hinausgehen. Man darf also wohl annehmen, daß Bernsteinsäure von Form III assimiliert wird.

Einwirkung auf verschiedene Zuckerarten.
(Prüfung des Gärvermögens.)

Marpmann[1]) gibt an, daß sein Saccharomyces niger bei Gegenwart von Dextrose in der Nährlösung schwache Gärung hervorgerufen habe. Mit Rücksicht hierauf wurde durch zwei Versuchsreihen geprüft, ob die von uns untersuchten Formen überhaupt befähigt sind, Zucker in Alkohol und Kohlensäure zu spalten.

In einem orientierenden Versuche kam die Kleingärmethode nach P. Lindner[17]) zur Anwendung. Wie Dachs[16]) durch seine Untersuchungen gezeigt hat, ist das Ergebnis der Kleingärmethode nicht ausschließlich für die Beurteilung auf Gärvermögen maßgebend. Die Kleingärmethode muß, wenn auch die Beobachtungsdauer länger ausgedehnt wird, noch durch einen Gärversuch in größerem Maßstabe nachgeprüft werden.

Beide Versuche wurden mit folgenden Zuckerarten angestellt: Dextrose, Laevulose, Saccharose, Maltose, Milchzucker und Galaktose. Die Kulturen wurden zu 25 Grad gebracht.

Die Kleingärmethode ergab überall ein negatives Resultat. Kohlensäurebläschen wurden auch bei Wiederholung des Versuches bei keiner Zukkerart während einer Beobachtungsdauer von 20 Tagen bemerkt.

Beim Versuch in größerem Maßstab wurde die mineralische Nährlösung nach Hayduck mit einem Zusatz von 5% des betreffenden Zuckers in Mengen von 50—60 ccm abgefüllt und mit den Organismen geimpft.

Nach 3 Wochen hatte kräftiges Wachstum stattgefunden. Die Kulturen wurden nun in folgender Weise auf die Gegenwart von Alkohol untersucht. Die ganze Nährflüssigkeit wurde in einen Destillierkolben gebracht und davon ungefähr 15 ccm abdestilliert. Die Prüfung des Destillates auf Alkohol erfolgte zunächst mittels der Jodoformreaktion.

Außerdem wurde das Destillat noch nach dem von Klöcker[18]) beschriebenen Verfahren, mittels dessen man noch die geringsten Spuren von Alkohol (0,02%) erkennen kann, nachgeprüft. In keinem der Destillate war Alkohol vorhanden. Damit war also auch das Ergebnis der Kleingärmethode durch den in größerem Maßstab durchgeführten Versuch völlig bestätigt. Die drei Pilzformen vermögen also keine alkoholische Gärung hervorzurufen, Zucker in Alkohol und Kohlensäure nicht zu spalten.

Verhalten gegenüber verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen.*)

Zweck des Versuches war, zu prüfen, ob die dunkel gefärbten Sproßpilze in der Lage sind, Stickstoff und Kohlenstoff aus verschiedenen Quellen zu verwerten, und welche von diesen das Wachstum am meisten begünstigt. Von Stickstoffquellen wurden Asparagin, Ammonsulfat und Pepton in die Versuchsreihe aufgenommen.

Asparagin erwies sich bei Gegenwart aller Zuckerarten als Stickstoffquelle sehr geeignet. Die einzelnen Organismen zeigten dabei in den äußeren Wachstumserscheinungen keine Verschiedenheit.

Ammonsulfat erschien dagegen unter den gleichen Verhältnissen weniger günstig. Wenn auch in den Kulturen noch eine gute Entwicklung stattgefunden hatte, so mangelte es doch fast überall an Farbstoff. Die Pilzrasen waren mißfarbig, braungrün bis graugrün.

Pepton, von allen drei Nährstoffen die schlechteste Stickstoffquelle, bot kaum für ein schwaches Wachstum genügend Nahrung. Eine Oberflächenvegetation fehlte ganz.

Als Kohlenstoffquellen dienten Dextrose, Saccharose und Maltose. Am besten wurde bei Gegenwart aller verwendeten Stickstoffquellen Dextrose assimiliert, weniger Saccharose. Bei Gegen-

*) Hinsichtlich der angewendeten Nährflüssigkeit und der äußeren Wachstumserscheinungen vergl. den Abschnitt Morphologie (Seite 37.)

wart letzterer kam aber immerhin noch ein kräftiges Oberflächenwachstum zustande. In noch geringerem Maße wurde unter den gegebenen Verhältnissen Maltose assimiliert. Oberflächenwachstum trat entweder überhaupt nicht auf, oder es waren nur schwache Anzeichen eines solchen vorhanden.

Die Assimilationsversuche mit verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen ergeben, daß die drei Pilze sowohl den Stickstoff wie auch den Kohlenstoff aus den verwendeten Nährflüssigkeiten zu assimilieren vermögen, daß jene aber hinsichtlich ihrer Verwertbarkeit durch die drei Pilze nicht auf gleicher Stufe stehen.

* * *

Aus den Ergebnissen der dargelegten Versuche geht hervor, daß die drei untersuchten Pilzformen von sogenannter „schwarzer Hefe" in morphologischer und physiologischer Hinsicht einander sehr nahe stehen. Die Verschiedenheiten der einzelnen Formen sind so gering, daß sehr wahrscheinlich nur Varietäten der gleichen Art in Frage stehen. Die folgende kurze Uebersicht der Versuchsergebnisse soll dies veranschaulichen.

Die 3 Pilzformen gehören zu den Hyphomyceten. Sie besitzen einerseits ein typisches Mycel von gleicher Stärke, annähernd gleichem Durchmesser, andererseits erzeugen sie ein Sproßmycel, das sich verschieden verhält. Das typische Mycel besteht aus wenig verzweigten Hyphen, welches entweder diesen direkt aufsitzende oder von einem

ganz kurzen Seitenast getragene Konidien erzeugt. Die Konidien vermehren sich entweder in zahlreichen Generationen durch Sprossung, oder sie wachsen direkt wieder zu Hyphen aus. Keine Sporenbildung in den Sproßzellen. Wandung der Hyphen und der Sproßzellen anfangs farblos, später olivgrün, häufig verdickt (Gemmen). Zellinhalt blaß, mit größeren, stark lichtbrechenden Körperchen. In Nährlösungen Entwicklung von Pilzrasen, sowohl an der Wand des Kulturgefäßes festsitzend, als auch frei schwimmend. Bei starkem Wachstum Vereinigung der festsitzenden Rasen zu einem Ring, der frei schwimmenden zu einer Pilzhaut. Pilzrasen dichtes Gewebe von Hyphen mit zahlreichen eingeschlossenen Konidien. Zottenbildung an der Oberfläche der Pilzrasen in sehr günstig zusammengesetzten Nährlösungen. Einzellkolonien auf festen Nährböden anfangs Typus 1, später Typus 2. Oberfläche der Riesenkolonien im ersten Entwicklungsstadium auf günstig wie auf ungünstig zusammengesetzten Nährböden ohne Luftmycel, mehr oder weniger glatt und dunkelgrün bis schwarz gefärbt (Charakter wie bei den Saccharomyceten). Auf günstigen Nährböden Oberfläche später grob gefaltet und von einem Pelz bedeckt (schimmelähnlich). Belag aus zwei Schichten: Luftmycel, dichtere Hauptschicht. Außerdem von der Unterseite des Belages aus lockere Fortsätze im Nährboden. Luftmycel: Hyphen oft in Bündeln, auf weniger günstigem Nährboden einreihige Verbände von Sproßzellen. Dichtere Hauptschicht im oberen Teile meist dunkelgrün, im unteren hellgrün gefärbt. Hauptschicht

aus Mycel und Sproßzellen zusammengesetzt. Hyphen der Fortsätze in festen Nährböden spiralig gewunden, steril oder mit Konidien; zuweilen reichlich verzweigte Verbände von langgestreckten Sproßzellen. Obere Grenztemperatur für die Vermehrung 35° C. Grenztemperatur bei 30 Minuten langem Erhitzen 48° C. Grenzkonzentration für die Vermehrung bei Zusatz von Aethylalkohol zu Würze 4 Volumprozente. Vollständige Abtötung der Aussaat bei 11 Volumprozenten. Widerstandsfähigkeit gegen Säuren gering. Keine Säureassimilation, ausgenommen Bernsteinsäure durch Form III. Kein Gärvermögen.

Die einzelnen Formen unterscheiden sich durch folgende Merkmale:

Form I.

Sproßzellen gestreckt-ellipsoidisch. Variationen: kugelförmig, langgestreckt, wurstförmig; oft apiculatusähnlich zugespitzt. Gestreckt-ellipsoidische Zellen 8,5 μ lang, 3,9 μ breit. Sproßzellen meist isoliert, ab und zu parallel gelagert, zuweilen zu je 3—5 in kreuz- oder sternförmiger Anordnung, Riesenzellen. Generationsdauer 5 Stunden 8 Minuten.

Form II.

Sproßzellen eiförmig. Variationen häufiger als bei Form I: kugelförmig, wurstförmig und unregelmäßig gestaltet. Sproßzellen einander mit breiter Basis aufsitzend und dauernd zu einreihigen oder verzweigten sparrigen Verbänden vereinigt. Eiförmige Zellen, 7,6 μ lang, 3,9 μ

breit, kugelförmige 5,15 μ. Generationsdauer 4 Stunden 48 Minuten.

Form III.

Sproßzellen kugelförmig. Variationen häufig: gestreckt-ellipsoidisch, eiförmig und wurstförmig. Zellinhalt etwas stärker lichtbrechend. Neigung zur Mycelbildung geringer als bei Form I und II. Hyphen sehr oft mit unregelmäßigen Anschwellungen. Durchmesser der kugelförmigen Sproßzellen 4,5 μ. Sproßzellen sehr frühzeitig getrennt. Selten Verbände von 4 bis 6 Gliedern. In vereinzelten Fällen Tochterzellen wie bei typischen Torulaformen rechtwinklig zueinander stehend. Riesenzellen. Generationsdauer 8 Stunden 13 Minuten. Assimilationsvermögen für Bernsteinsäure.

Nach eingehender Darlegung der Morphologie der als Saccharomyces niger und „schwarze Hefe“ bezeichneten Organismen ist noch die Frage der systematischen Stellung jener Formen zu erörtern. Infolge der von Hansen ausgesprochenen Anschauung, nach welcher sich die sogenannten „schwarzen Hefen“ an Cladosporium oder Fumago angliedern, lag es nahe, verschiedene Arten dieser beiden Pilzgruppen mit den drei untersuchten Formen zu vergleichen. Zu diesem Zwecke dienten Reinkulturen von Cladosporium herbarum und einigen Fumagoarten von Getreideähren, Haselnuß, Lorbeer und Ahorn. Allein schon bei oberflächlicher Betrachtung der Kulturen zeigte sich, daß unsere drei Pilzformen mit dem Vergleichsmaterial kaum Aehnlichkeit hatten.

Guilliermond zufolge sollen sich die „schwarzen Hefen" an Dematium anschließen. Daher wurden auch in dieser Richtung Vergleiche angestellt. Nun besteht zwar, besonders hinsichtlich der Konidienbildung eine gewisse Aehnlichkeit mit Dematium, immerhin besteht aber auch wieder ein großer Unterschied gegenüber Dematium in der Art und Weise, wie bei unseren drei Pilzformen die Konidien angeordnet sind.

Wesentliche Unterschiede ergeben sich durch die Gemmenbildung bei Dematium, die Zerteilung der Hyphen in kurze, mehr oder weniger dunkelbraun gefärbte Glieder, die vielfach durch Vertikalwände nochmals geteilt erscheinen, ferner durch die Durchwachsungserscheinungen, endlich durch die Veränderung der Kulturflüssigkeiten, welche bei Dematium fadenziehend werden.

Für die Bestimmung der systematischen Stellung der drei Pilzformen reichen die mit den von mir verwendeten Methoden erlangten Resultate nicht aus, und es wäre deshalb auch unangebracht, eine neue Benennung für sie vorzuschlagen. Die Entscheidung hierüber müßte weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Soviel steht aber jedenfalls fest, daß die Bezeichnungen Saccharomyces niger, Torula nigra und „schwarze Hefen" für die beschriebenen drei Pilzformen, da sie in keiner Weise gerechtfertigt sind, fallen müssen.

Literatur.

1. Marpmann, G., Zentralblatt für allgemeine Gesundheitspflege, 1886, S. 422.
2. Hansen E. Chr., Allgem. Brauer- und Hopfenzeitung, 1887, *27*. S. 1109.
3. Lindner P., Wochenschrift für Brauerei, 1887, *4*. S. 853.
4. Guilliermond A., Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures à formes levures. Lyon 1902. S. 211.
5. Lindner P., Mikroskopische Betriebskontrolle. 5. Aufl. S. 484.
6. Buxton B. H., American Medicine, 1903, *5*. S. 137 bis 142.
7. Zikes H., Zentralbl. f. Bakteriol. II. Abt. *30*. 1911, S. 145.
8. Will H., Anleitung zur biologischen Untersuchung usw. München 1909. Anhang S. 445.
9. Lindner P., Mikroskop. Betriebskontrolle, S. 230.
10. Lindner P., Mikroskop. Betriebskontrolle, S. 247.
11. Wichmann-Zikes, Allg. Zeitschr. f. Bierbrauerei und Malzfabrikation, 1905, *33*. S. 1.
12. Will H., Anleitung zur biologischen Untersuchung usw. München 1909, S. 83.
13. Will H., Anleitung zur biologischen Untersuchung usw. München 1909, S. 108.
14. Hoyer D. P., Allg. Zeitschr. f. Bierbrauerei und Malzfabrikation, *28*. 1900. S. 37.
15. Pedersen, Compt. rend. Carlsb. Laborat. I. 1878. Seite 22.
16. Dachs, Zentralbl. f. Bakt. usw. II. *21*. 1908. S. 389.
17. Lindner P., Mikroskop. Betriebskontrolle, S. 275.
18. Klöcker Alb., Compt. rend. Laborat. Carlsberg, *10*. 1. Lfg. 1911, S. 99.

* * *

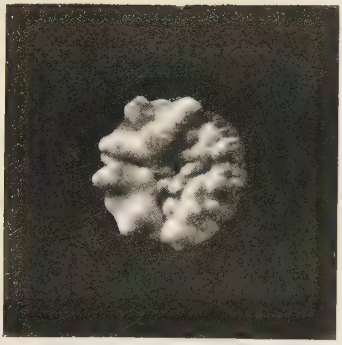

Fig. 1. Form I auf gehopfter Würzegelatine.

Fig. 2. Form II auf gehopfter Würzegelatine.

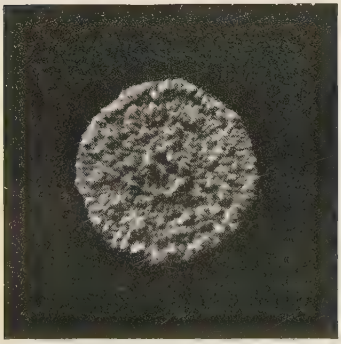

Fig. 3. Form III auf gehopfter Würzegelatine.

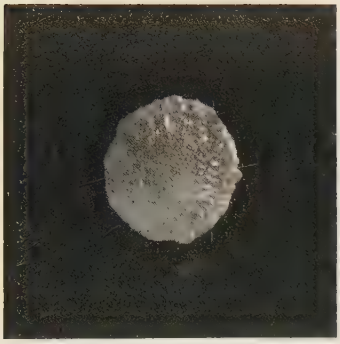

Fig. 4. Form I auf Gelbrübenwassergelatine.

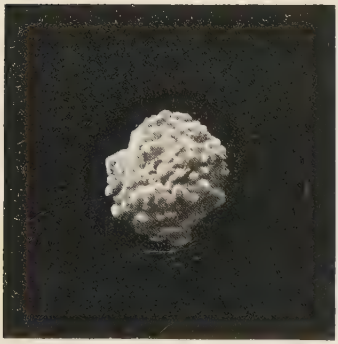

Fig. 5. Form II auf Krautwassergelatine.

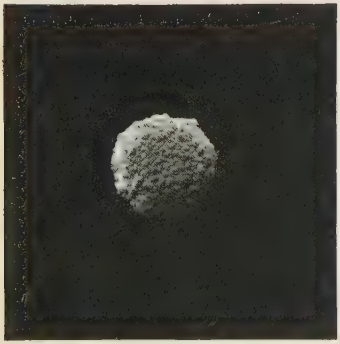

Fig. 6. Form III auf Krautwassergelatine.

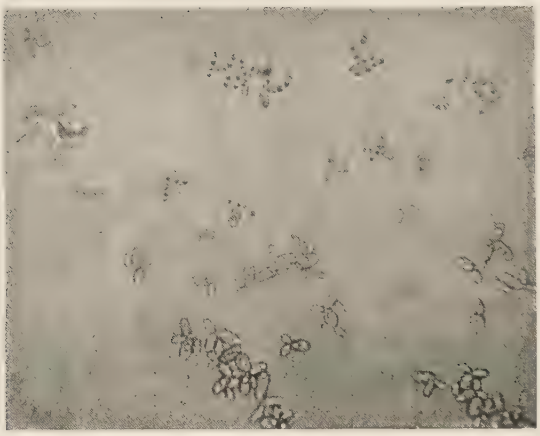

Fig. 1. Form I. Sproßzellen mit Fetttröpfchen, Kreuzbildung. 14 Tage alte Tröpfchenkultur. 450 : 1.

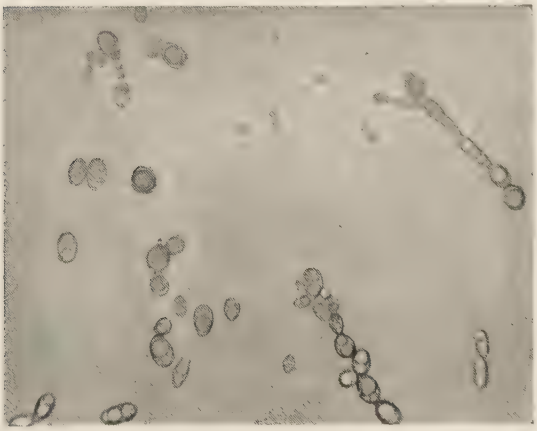

Fig. 2. Form III. Sproßzellen mit sporenähnlichen Fetttröpfchen aus dem Pilzring einer 2 Monate alten Würzekultur. 450 : 1.

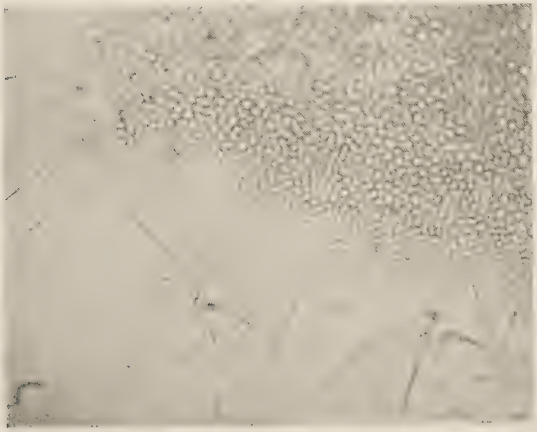

Fig. 3. Form I. Zu Hyphen auswachsende Sproßzellen. 8 Tage alte Tröpfchenkultur auf Böttcherscher feuchter Kammer. 300 : 1.

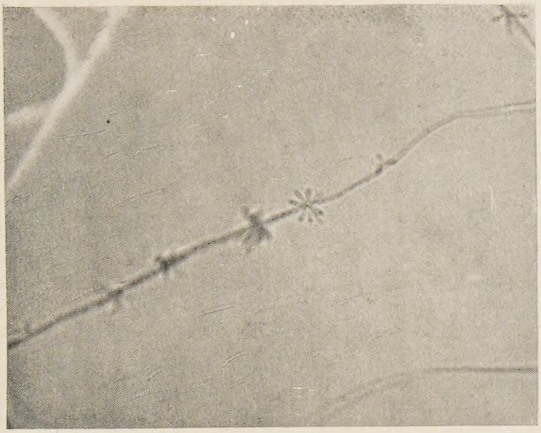

Fig. 4. Form I. Hyphe mit Konidien. 14 Tage alte Tröpfchenkultur auf Böttcherscher feuchter Kammer. 450 : 1.

Fig. 5. Form II. Hyphen mit Konidien. 6 Wochen alte Tröpfchenkultur nach Wichmann-Zikes. 400 : 1.

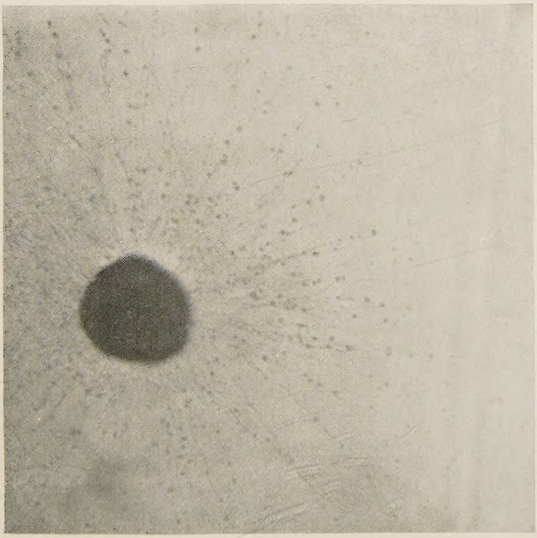

Fig. 6. Form II. Pilzkolonie, 6 Wochen alt, angelegt nach Wichmann-Zikes (Tröpfchenplattenverfahren.) 70 : 1.